

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie
Studijní obor Biologie



Barbora Kykalová

Určování zdrojů krve u flebotomů a dalších krevsajících členovců
Identification of bloodmeal sources in phlebotomine sand flies and other
bloodfeeding arthropods

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Vít Dvořák, Ph.D

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.05.2017

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Vítovi Dvořákovi za velkou dávku trpělivosti, poskytnuté konzultace a odborné rady, které mi pomohly při sepisování této práce. Poděkování patří také mým nejbližším, kteří mě vždy podporovali a často mi byli ve studiu inspirací.

Abstrakt:

Z hlediska lidské a veterinární medicíny mají velký význam krevsající členovci, kteří se uplatňují při přenosu řady infekčních chorob. Identifikace krevních zdrojů významně napomáhá k lepšímu pochopení problematiky přenašeči šířených onemocnění a objasnění vztahu vektor – hostitel. Určení krevních zdrojů přináší epidemiologicky cenné informace o rezervoárových zvířatech a míře antropofilie studovaných členovců. Metody identifikace se vyvíjely v průběhu času od terénních pozorování, přes sérologické a DNA detekční metody až k proteinovým analýzám. Dnes jsou nejhojněji využívány DNA detekční metody, ale dochází k dalšímu zdokonalování stávajících a zavádění metod nových.

Předložená bakalářská práce shrnuje a porovnává použité metody s primárním zaměřením na flebotomy, přenašeče leishmanióz.

Klíčová slova: flebotomové, identifikace krevních zdrojů, krevsající členovci, analýza

Abstract:

Hematophagous arthropods that are involved in transmission of many infectious diseases have profound importance in human and veterinary medicine. Bloodmeal identification considerably contributes towards better understanding of vector-borne diseases and vector-host interaction. It reveals epidemiologically significant data on reservoir hosts and degree of anthropophily of studied arthropods. Methods of bloodmeal identification evolved from field observations, serological and DNA-based methods towards protein analyses. Nowadays, the most frequent methods are DNA-based methods but new methods are still being developed.

This bachelor thesis summarizes and compares used methods with the primary focus on phlebotomine sand flies, which are involved in transmission of leishmaniasis.

Key words: sand flies, bloodmeal identification, hematophagous arthropods, analysis

Seznam zkratek:

ADP	Adenosindifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
COI	Podjednotka I cytochrom c oxidázy
<i>CytB</i>	Cytochrom B
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Double-stranded DNA
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
Fc fragment	Fragment crystallizable region
GalNAc	N-acetylgalaktosové epitopy
HDA	Analýza heteroduplexů
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
LPG	Lipofosfoglykan
MALDI TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
PCR	Polymerase chain reaction
PHI	Passive hemagglutination inhibition
PM	Peritrofická matrix
PNOC	Prepronociceptin
QPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RLB	Reverse line blotting
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SIA	Stable isotope analyses
T-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism
UV	Ultrafialové
WHO	World health organization

Obsah

1. Úvod	1
2. Charakteristika podčeledi Phlebotominae	2
2.1 Výskyt a význam pro člověka	2
2.2 Ekologie	4
3. Stručná anatomie trávicí soustavy flebotomů a fyziologie sání	4
3.1 Anatomie trávicí soustavy	4
3.2 Vyhledávání hostitele a sání krve	5
3.3 Trávení krve	6
4. Identifikace krevních zdrojů	6
4.1 Sérologické metody	7
4.1.1 Historický přehled sérologických metod identifikace nasáté krve	7
4.1.2 ELISA	9
4.2 DNA detekční metody	10
4.2.1 Sekvenační analýza	11
4.2.2 Multiplex PCR	15
4.2.3 QPCR	16
4.2.4 Analýza heteroduplexů (HDA)	17
4.2.5 PCR RLB Hybridizace	18
4.2.6 PCR-RFLP	20
4.2.7 DNA profilování	22
4.3 Analýza proteinů	23
4.4 Analýza stabilních izotopů	24
5. Závěr	25
Seznam použité literatury	28
Primární citace	28
Sekundární citace	36

1. Úvod

Flebotomové jsou zástupci hematofágního dvoukřídlého hmyzu, kteří mají přes svou drobnou velikost značný medicínský a veterinární význam, neboť se uplatňují jako přenašeči některých infekčních chorob, a to jak zvířecích, tak lidských. Jejich výskyt se omezuje zejména na tropické a subtropické aridní oblasti v rozmezí 50° s.š. až 40° j.š., ale stále častěji nalézáme zástupce i mimo tyto oblasti. Zdá se, že v důsledku klimatických změn dochází v Evropě k šíření flebotomů a posouvání hranic výskytu jednotlivých druhů (Medlock *et al.*, 2014).

Riziko výskytu flebotomů tkví v přenosu patogenů, a to zejména prvoků z rodu *Leishmania*, některých arbovirů a v Jižní Americe také bakterie *Bartonella bacilliformis*. Leishmánie způsobují choroby, leishmaniózy, jež dle WHO patří mezi 10 nejvýznamnějších lidských onemocnění (WHO, 2010). Tato onemocnění, která mohou mít až smrtelné následky, ohrožují 350 miliónů lidí a ročně přibývá až 2 milióny nových případů, zejména v nejohroženějších oblastech, kterými jsou tropické rozvojové země (WHO, 2010). Do těla hostitelů se patogeny dostávají během sání krve infekční samice.

Při studiu vztahů mezi vektorem a hostitelem považujeme za důležité věnovat se potravním návykům flebotomů v přirozeném prostředí, zejména v periurbánních oblastech, kde vektor přichází do styku s člověkem. Jednou z možností studia je identifikace krevních zdrojů z nasátých samic. Techniky, které lze při identifikaci využít, jsou i předmětem mé bakalářské práce. Studium potravních zdrojů ve volné přírodě, můžeme lépe porozumět jejich chování a preferencím, což může mít velký význam pro boj s těmito vektory a zejména s jimi přenášenými nemocemi.

Cílem mé práce je podat ucelený přehled o metodách využívaných pro identifikaci krevních zdrojů hematofágních členovců s primárním zaměřením na flebotomy. Metody budu jednotlivě představovat jak z metodického hlediska, tak jejich použití v konkrétních studiích. Dále budu metody porovnávat a diskutovat jejich výhody i nevýhody. Všechny techniky budou doplněné o informaci o jejich využití i u jiných krevsajících členovců a do práce zahrnu i takové metody identifikace, které zatím u flebotomů nebyly použité.

2. Charakteristika podčeledi Phlebotominae

Flebotomové (*Diptera:Psychodidae:Phlebotominae*) jsou drobný krevsající hmyz spadající do řádu dvoukřídlých, podřádu *Nematocera*, čeledi *Psychodidae* a podčeledi *Phlebotominae*. Stejně jako další mnozí zástupci tohoto řádu patří mezi nepříjemné trapiče, avšak jejich hlavní význam tkví v přenosu infekčních onemocnění, a to včetně těch lidských.

2.1 Výskyt a význam pro člověka

Podčeď *Phlebotominae* a její taxonomie má za sebou dlouhý vývoj a ani dnes není jejich klasifikace zcela ustálená. Nejen z tohoto důvodu se stále užívá tradiční a praktické, avšak dle předpokládané fylogeneze skupiny ne zcela odpovídající, rozčlenění do šesti rodů: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Chinius* obývajících území Starého světa, a rody *Lutzomyia*, *Brumptomyia* a *Warileya* na území světa Nového (Akhoundi *et al.*, 2016). Dnes je již popsáno více než 900 druhů tohoto hmyzu, i když vůbec první popis flebotoma v rámci skupiny *Psychodidae* byl, podle dostupných informací, proveden až v roce 1786, a to italským přírodovědcem a lékařem J.A. Scopolim v jednom z jeho přírodovědných spisů.

Flebotomové ze Starého světa obývají v různé míře většinu biogeografických oblastí (Akhoundi *et al.*, 2016). K nejsevernějšímu nálezu flebotoma v rámci Starého světa došlo na území Evropy v roce 2013, konkrétně na území Hesenska ve středním Německu a jednalo se o druh *Phlebotomus mascittii* (Melaun *et al.*, 2014). V Novém světě se vyskytují flebotomové v nearktické a neotropické biogeografické oblasti a největšího významu zajisté dosahuje rod *Lutzomyia*, který zahrnuje mnoho podrodů s medicínským významem. Geografické rozšíření v současnosti podléhá změnám, souvisejícím patrně s různými aspekty lidské činnosti, neboť na některých územích je dokázáno jejich šíření do nových oblastí (Maroli *et al.*, 2008) i biotopů (Brazil, 2013). I v rámci Evropy dochází k rozšiřování území a posouvání hranic některých druhů flebotomů, zřejmě v důsledku klimatických změn a lidské činnosti (Medlock *et al.*, 2014).

Flebotomové jsou nepříjemnými trapiči, ale důležitou úlohu hrají především v roli přenašečů. Všichni významní zástupci z hlediska humánní medicíny spadají do dvou rodů, do rodu *Lutzomyia* v Novém světě a do rodu *Phlebotomus* ve Starém světě (Lewis, 1982). Známí jsou především účastí v přenosu infekčních chorob, leishmanióz. Jedná se o onemocnění způsobené protozoárními parazity z rodu *Leishmania* (*Euglenozoa:Trypanosomatidae*) a rody *Phlebotomus* a *Lutzomyia* jsou považovány za jediné přirozené přenašeče tohoto onemocnění, s jednou prokázanou výjimkou na území Austrálie. Tam byli nalezeni hematofágní zástupci z čeledi *Ceratopogonidae*, kteří byli prokazatelně kolonizováni prvky z rodu *Leishmania* (Dougall *et al.*, 2011).

Onemocnění se šíří z ohnisek, které Maroli, ve své studii viscerální leishmaniózy způsobené *L. infantum*, definoval pomocí třech kritérií: I – na území byl potvrzen minimálně jeden případ infekce, II – mezi asymptomatickými rezervoárovými zvířaty musí být alespoň dvě séropozitivní a III – existuje záznam o zástupcích rodu *Phlebotomus*, vyskytujících se v této oblasti (Maroli *et al.*, 2013).

I přes to, že je dnes celkově známo více než 900 druhů flebotomů, většina z nich nehraje v přenosu leishmaniózy roli. Na zapojení konkrétního druhu flebotoma do přenosu se totiž podílí mnoho faktorů, z nichž některé souvisí s molekulárními interakcemi mezi parazitem a přenašečem a také z potravními preferencemi jednotlivých druhů flebotomů. Zapojení konkrétního druhu flebotoma v přenosu leishmanie se posuzuje podle pěti kritérií: I - vektor musí být antropofilní; II – zároveň musí sát krev i na rezervoárovém zvířeti; III – stejný druh leishmanie se nachází v pacientovi i ve vektoru, v jeho přirozeném prostředí; IV – parazit je schopen následného vývoje uvnitř vektora; V – vektor musí být schopen parazita přenést během sání (WHO, 2010).

Například role rodu *Sergentomyia* v přenosu lidských patogenů není stále zcela objasněná a dnes je předmětem mnoha studií. I přes to, že *Sergentomyie* jsou spojovány se sáním na plazech a přenosem rodu *Sauroleishmania*, není výjimkou, že se nasají na savcích, a to dokonce i na lidech (Depaquit *et al.*, 2014; Azizi *et al.*, 2016; Senghor *et al.*, 2016). Je tedy možné, aby někteří zástupci rodu *Sergentomyia* sáli jak na rezervoárovém zvířeti, tak na lidech. Při výzkumu na území Mali, rozkládajícím se v oblasti Sahelu, byla pomocí metody PCR identifikována DNA *Leishmania major* v samicích rodu *Sergentomyia*, z nichž jedna byla pozitivní i na lidskou DNA (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012). Studie z oblasti Mont-Rolland v Senegalu přinesla další důkazy možné role rodu *Sergentomyia* v přenosu. Někteří zástupci v této oblasti byli pozitivní na DNA *Leishmania infantum* a zároveň více než 30 % psů a 20 % lidí je v oblasti na *L. infantum* séropozitivních. Navíc bylo zjištěno, že 2% pozitivních samic bylo nenasátých, což by znamenalo, že paraziti přežili proces trávení, nebo vykladení samice (Senghor *et al.*, 2016). *Sergentomyie* tedy alespoň částečně splňují některá kritéria jako vektoři leishmanióz, budoucí studie by se měly zabývat otázkou, zda mohou být splněna všechna kritéria, čímž by role rodu *Sergentomyia* v přenosu leishmanií ve Starém světě byla potvrzena či vyvrácena (Maia & Depaquit, 2016).

Vedle leishmanióz se flebotomové uplatňují také v přenosu bakteriálních a virových patogenů. Rod *Lutzomyia* je považován za jediného přirozeného přenašeče bakterie *Bartonella bacilliformis*, způsobující horečku Oroya (Ready, 2013). Řada druhů rodu *Phlebotomus* se také účastní přenosu arbovirů, které se dají rozdělit do tří skupin: Phleboviry z čeledi *Bunyaviridae* (např. Toscana virus nebo Sicilian virus), Vesiculoviry z čeledi *Rhabdoviridae* (např. Chandipura virus) a Orbiviry z čeledi *Reoviridae* (např. Changuniola virus) (Depaquit *et al.*, 2010).

2.2 Ekologie

Životní cyklus flebotomů má svá specifika a v mnohém se liší od jiných sangvivorních Dipter. Larvy nejsou vázány na vodní prostředí, ale vyvíjejí se ve stinných a vlhkých místech s dostatkem organického materiálu, jakými mohou být například vlhké půdy jeskyní, pralesů, nory hlodavců apod. Larvy se vzhledem ke své nepatrné velikosti a specifické ekologii nalézají jen velmi obtížně. To je překážkou při studiu ekologie a chování tohoto hmyzu, neboť jen velmi zřídka se podaří nalézt líhniště v přirozeném habitatu. Proto většina znalostí, které o životním cyklu máme, pochází z laboratorních chovů. U prokázaných nebo předpokládaných přenašečů známe přirozená líhniště zhruba u poloviny druhů ve Starém světě a pouze necelé třetiny druhů v Novém světě, což celkově představuje asi 3 % z podčeledi *Phlebotominae* (Felicangeli, 2004). Právě kvůli skutečnosti, jak málo víme o líhništích flebotomů, je i boj proti těmto vektorům obtížný a zaměřený zejména na dospělá stadia. V boji se využívá sprejování insekticidy (zejména pyrethroidy) a to jak lidských obydlí, tak zvířecích chlévů a stájí. Další formou boje/ochrany jsou repelenty, repelentní obojky pro psy a sítě do oken ošetřené insekticidy (Killick-Kendrick, 1999; Alexander & Maroli, 2003).

3. Stručná anatomie trávicí soustavy flebotomů a fyziologie sání

U hematofágických zástupců podřádu *Nematocera* parazitují pouze samičky, nejinak tomu je i v případě podčeledi *Phlebotominae*. Obě pohlaví sají cukerné šťávy, které využívají jako zdroj energie pro let i další pohyb, těmito šťávami jsou nejčastěji květní nektary. Samičky využívají pro tvorbu snůšky vajíček navíc proteiny z nasáté krve. K vykladení samice je zapotřebí jednoho či více sání v závislosti na druhu a životním cyklu. Některé druhy jsou však schopné udělat první snůšku úplně bez nasátí, tzv. autogenie (Killick-Kendrick, 1999). Výběr hostitelů je dán zejména preferencemi jednotlivých druhů a nabídkou okolí.

3.1 Anatomie trávicí soustavy

Hematofágie vznikla v evoluci hmyzu několikrát nezávisle na sobě, ale u všech organismů se musely vyvinout speciální adaptace pro tento druh potravy. Zejména ovlivněná je trávicí soustava, která musela projít mnohými přeměnami i u samic flebotomů. Stejně jako u dalších členovců se dělí trávicí soustava dvoukřídlých na tři hlavní oddíly, přední stomodeum, střední mesenteron a zadní proktodeum. Jednotlivé části se mezi sebou liší původem, zatímco stomodeum a proktodeum jsou původu ektodermálního, mesenteron má původ v entodermu a díky tomu také své specifické vlastnosti (Eldridge & Edman, 2003).

Ve stomodeální části soustavy, která je vystlána kutikulou, dochází k příjmu a mechanickému zpracování potravy. Ústní ústrojí flebotomů je uzpůsobené k penetraci hostitelské pokožky a narušování tkání, v důsledku čehož vznikají v místě vpichu malé hematomy, ze kterých následně sají krev. Tento způsob sání se nazývá thelmofágie a je bolestivější než bodnutí solenofágního hmyzu, který svými tenkými stiletý nabodává cévu, ze které saje přímo. Ústní ústrojí flebotomů se skládá z nepárového horního pysku (labra) a hypofarynxu a párových maxil a mandibul, které slouží jako čepel k probodnutí pokožky a ze spodního pysku (labia), jehož funkcí je ochrana citlivých částí ústrojí (Mullen & Durden, 2009). Jejich ústní ústrojí je zároveň natolik krátké, že u lidských hostitelů nedokáží překonat vrstvu oblečení a mohou sát pouze na odhalených částech pokožky, a to jen z nejsvrchnějších kapilár, neboť svým sosákem dokáží penetrovat pouze 0.5 mm do hostitelské tkáně (Francischetti, 2010).

Střední část střeva neboli mesenteron začíná stomodeální valvou a jako jediný oddíl trávicí soustavy není vystlána kutikulou, neboť je entodermálního původu a dochází zde k vlastnímu trávení přijaté potravy. Trávení u hmyzu je extracelulární, zajišťované enzymy, které jsou přímo sekretovány do lumenu mesenteronu. Přijatou potravu v mesenteronu obklopuje peritrofická matrix (dále PM). PM se v různých formách tvoří u většiny, nikoli však u všech zástupců hmyzu. Odděluje mezi sebou endoperitrofický a ektoperitrofický prostor a slouží jako mechanická bariéra mezi epitelem mesenteronu a přijatou potravou. Střední střevo chrání před mechanickým poškozením, toxiny, chemickými látkami a zejména nejrozumnějšími patogeny (Lehane, 1997).

Zadní střevo neboli proktodeum je stejně jako stomodeum ektodermálního původu a je vystláno chitinovou kutikulou. Začíná pylorem, kam ústí vylučovací soustava v podobě malpighických trubic. Celá trávicí trubice je ukončena rektumem a análním otvorem, kterým z těla odchází zbytky nestrávené potravy.

3.2 Vyhledávání hostitele a sání krve

Proces sání charakterizují tři hlavní fáze: vyhledávání hostitele, samotný příjem potravy a následné trávení krve. Při vyhledávání hostitele se uplatňují atrahující signály, těmi jsou u flebotomů nejčastěji signály pachové.

Samotný příjem krve je kritickým okamžikem, při němž se jedinec snaží nasát bez vyvolání obranné reakce hostitele. Hematofágním členovcům pomáhají během sání sliny, které se dostávají do místa vpichu hostitele a modifikované ústní ústrojí. Sliny mají bohaté proteinové složení a jejich hlavní funkcí je potlačení hemostatické a obranné reakce hostitele na bodnutí. Hemostáze je komplexním dějem sestávajícím z procesu koagulace, agregace a degradace trombocytů a vazokonstrikce. Nejznámější složkou slin jsou ubiquitinylované enzymy zvané apyrázy, ze skupiny fosfatáz, které brání aktivaci agregace a degranulace trombocytů a působí protizánětlivě (Francischetti, 2010).

Sání může být ovlivněno různými faktory, jedním z nich je parazitární manipulace hostitelem. Jedná se o proces, ve kterém se parazit snaží pomocí svého přenašeče zvyšovat šanci na přenos. Tato manipulace byla pozorována i mezi flebotomy a leishmáními. Leishmánie znesnadňuje svému mezipřenositeli sání krve, čímž dochází k opakovaným pokusům o dokončení krmení a zvýšení pravděpodobnosti přenosu. Tento jev byl nazván „blocked fly hypothesis“ a rozvíjen v mnoha studiích (Rogers, 2012; Rogers *et al.*, 2008; Rogers & Bates, 2007). Promastigotní stádia parazita produkují v okolí stomodeální valvy gel s hlavní složkou proteofosfoglykanem, který tvoří zátku a krev je pouze s obtížemi nasávána do mesenteronu. Toto neefektivní sání způsobuje opakované pokusy vektora o dokončení krmení a navíc promastigoti, umístění před zátkou, jsou během sání vypuzeni do těla hostitele (Hurd, 2003).

3.3 Trávení krve

Po příjmu putuje krev do mesenteronu, kde je obalena PM a kde je v procesu diureze odstraněna přebytečná voda, čímž dochází k zahuštění přijaté potravy. Voda se vstřebává přes epitel mesenteronu a je vylučována z těla pomocí malpighických trubic, které ústí do rekta v zadní části střeva. V zahuštěné krvi dochází k hemolýze erytrocytů a následnému vlastnímu trávení pomocí hydrolytických enzymů. Kromě vzrůstu enzymové aktivity během trávení dochází i ke změnám na buněčné úrovni, zejména k nárůstu množství hrubého endoplazmatického retikula a zásobních lipidů v epitelálních buňkách mesenteronu (Dillon & Lane, 1993).

4. Identifikace krevních zdrojů

Určení potravních zdrojů krevsajících členovců významně přispívá ke studiu ekologie a boji s vektory významných lidských i zvířecích infekcí. S narůstajícími nároky na přesnost a dostupnost identifikace se vyvíjely a stále vyvíjí i používané techniky. Dříve bylo určení hostitelů založené pouze na terénním pozorování krmení v přirozeném habitatu. Postupem času se začalo využívat nasáté krve jako substrátu pro identifikační metody (Washino & Tempelis, 1983). Abychom byli schopni určit hostitelský zdroj flebotomů, musí být nasátá krev vyizolována z mesenteronu samice. Objem nasáté krve je ovlivňován druhem flebotoma, jeho tělesnými proporcemi, krevním zdrojem či případnou infekcí samice, obecně se ale pracuje s velmi malým množstvím počátečního materiálu. Průměrně se objem nasáté krve pohybuje mezi 0.1-1.0 μ l (Baum *et al.*, 2015; Daba *et al.*, 2004; Pruzinova *et al.*, 2015).

V trávicím traktu, v rámci zpracování přijaté potravy, dochází k postupné degradaci krevních proteinů i nukleových kyselin obsažených v krevních buňkách, a proto se identifikace stále více znesnadňuje. Doba trávení i enzymová aktivita jsou opět specifické pro konkrétní druh. Studie, která porovnávala procesy trávení u dvou druhů, *Phlebotomus papatasi* a *Phlebotomus langeroni*, zkoumala

zejména optima a aktivity proteáz, trypsinu a aminopeptidáz v průběhu času. U druhu *Phlebotomus papatasi* nastal prudký nárůst v aktivitě proteáz po 24-34 hodinách a všechny proteázové (endo- i exoproteázové) aktivity byly dokončené 50 h po sání, kdežto u *P. langeroni* tento nárůst nastal až po 33-48 hodinách a aktivity skončily 72 hodin po sání. Celková doba trávení obou druhů je <58 h u *P. papatasi* a 58-72 h u *P. langeroni*. Rozdíly logicky nastávají i v následujícím procesu defekace, která může nastat u některých druhů už 32 hodin po sání (*P. argentipes*) nebo u jiných až 6 dnů po sání (*P. orientalis*) (Pruzinova *et al.*, 2015). Jak je vidět, doba trávení může být velice různá i v rámci jednoho rodu, s tím souvisí i výběr vhodné identifikační metody. Stupeň degradace krevních složek lze u čerstvě chycených jedinců zhruba odvodit z barvy tráveniny ve střevě, která se s přibývajícím stupněm trávení zbarvuje od červené až k hnědočerné. Výběrem identifikační metody můžeme ovlivnit pravděpodobnost správného určení krevního zdroje, tedy hostitele. V závislosti na zkoumaných složkách krevního séra se metody identifikace dají rozdělit do několika kategorií: sérologické metody, DNA detekční metody, metody založené na analýze proteinů a metody založené na analýze stabilních izotopů.

4.1 Sérologické metody

Terénní pozorování začala být brzy nedostačujícími technikami určování hostitelů hematofágního hmyzu a poptávka po nových metodách se stále zvyšovala (Washino & Tempelis, 1983). První kategorií technik, které se začaly pro identifikaci využívat, jsou serologické analýzy. Jedná se o metody založené na specifických reakcích mezi antigenem a protilátkou, přičemž jedna ze složek je vždy známá a druhá studovaná. Principem sérologických metod při určování hostitelů hematofágního hmyzu je navázání hostitelsky specifických protilátek na antigeny přítomné v krevním séru.

Dnes je identifikace stále více založena na detekci DNA, která mnohé imunologické techniky již téměř vytlačila. Důvodem je zejména velké množství omezení, jako jsou: časová náročnost, výrazně nižší sensitivity, nutnost mít k dispozici specifické protilátky proti všem potencionálním hostitelům nebo možná zkřížená reakce mezi blízké příbuznými druhy (Sant'Anna *et al.*, 2008; Valinsky *et al.*, 2014). Z tohoto důvodu jsem se rozhodla pojmut kapitulu o sérologických metodách jako historický přehled s větším důrazem pouze na metodu imunoenzymatické reakce (ELISA), která je i dnes běžně využívanou technikou při studiu potravních návyků.

4.1.1 Historický přehled sérologických metod identifikace nasáté krve

Nejčastěji používanou metodou v historii určování hostitelů z nasáté krve je precipitinový (srážecí) test (Washino & Tempelis, 1983). Ten je založen na tvorbě sraženiny, která vzniká po navázání protilátky na koloidní antigen. Existuje mnoho variant, které se dají základně dělit na precipitaci v roztoku a precipitaci v gelu, přičemž srážení v roztoku se pro určení hostitelů využívalo

mnohonásobně více. Použití precipitinového testu pro určení hostitelů hematofágního hmyzu navrhl a poprvé testoval Bull & King v roce 1923. Jednalo se o studii potravních návyků přenašečů malárie na území Louisiany, kde bylo použito celkem osm specifických protilátek proti potencionálním hostitelům (Bull & King, 1923). Od té doby byla precipitace opakovaně využívána za účelem identifikace hostitelů u téměř všech skupin hematofágních členovců, a to s menšími i většími modifikacemi. Jako příklad využití této metody u flebotomů v novější práci lze uvést studii potravních preferencí samic z rodu *Lutzomyia* ve městě Manaus v Brazílii. Flebotomové na území města přenáší americkou kutánní leishmaniózu, která zde dosahuje nejvyššího počtu nálezů z celé Brazílie. Terénní sběry byly zaměřeny na lesnatou oblast kampusu Universidade Federal do Amazonas. Nasáté samice byly podrobeny precipitinovému testu za účasti pěti specifických protilátek připravených v králících. Preferovanými hostiteli se ukázali být hlodavci, což může souviset s enviromentálními změnami, způsobenými zejména kácením okolních lesů (Da Rocha Nery *et al.*, 2004).

Obě výše zmíněné studie pracovaly s technikou precipitace v roztoku, která byla obecně rozšířenější. Nicméně pro identifikaci krevních zdrojů byla využita i precipitace v gelu. Princip metody je stejný jako u srážení v roztoku. Do agarózového gelu se připraví jamka se specifickou protilátkou a série jamek, do kterých je přidán antigen. Dojde-li mezi jednotlivými složkami k reakci, sráženiny vytvoří v gelu tzv. precipitační linie. Poprvé byla tato technika použita při studiu potravních zdrojů komárů a i nadále našla uplatnění zejména u této skupiny hmyzu (Chamberlain & Sudia, 1967 podle Crans, 1969). Výjimkou je identifikace hostitelů flebotomů z indického města Pondicherry, kde byla technika difúze v agarózovém gelu použita pro lepší pochopení ekologie a potravních preferencí vektorů leishmaniózy. Vzorky byly získány z urbánních, periurbánních a rurálních oblastí a testovány pro čtyři skupiny hostitelů. Z výsledků bylo patrné silné antropofilní chování druhů *P. papatasi* a *P. argentipes* (Srinivasan & Panicker, 1992).

Precipitinový test se nicméně ukázal být nedostatečně sensitivní metodou, a proto stále rostly požadavky na nové techniky s vyšší citlivostí. Jednou z nich je inhibice hemaglutinace, PHI (Passive Hemagglutination Inhibition). Jedná se o aglutinační reakci na nosičích, kterými jsou v tomto případě erytrocyty. Na povrch erytrocytu jsou uměle navázány antigeny, které specificky reagují se známými protilátkami. V případě, že erytrocyty neaglutinují, protilátky se navázaly na antigen a obráceně. Tato metoda se projevila být asi 1000krát citlivější než precipitinový test, ale i přesto nebyla nikdy hojně využívána. Důvodem byla zřejmě její větší náročnost (Washino & Tempelis, 1983). Poprvé byla PHI metoda využita pro výzkum potravních návyků glosin (*Glossinidae*). V této práci byl v první řadě použit precipitinový test pro širší identifikaci hostitelů a všechny pozitivní vzorky byly podrobeny pasivní hemaglutinaci pro přesnější zařazení hostitelů, a to v některých případech až na úroveň druhu (Weitz, 1963). Technika nedošla přílišného uplatnění, byla použita pouze pro identifikaci krve nasátých samic flebotomů ze Západního Bengálska (Boreham, 1975 podle Washino, 1983).

Poslední zmíněnou technikou, která byla použita pro identifikaci nasáté krve samic flebotomů je střetná (protisměrná) imuno elektroforéza, kdy jsou do agarózového gelu připraveny dvě řady jamek, které směřují proti sobě. Do jedné řady jsou přidány specifické protilátky a do druhé vzorek s antigenem. Pohyb složek je urychlen pomocí stejnosměrného elektrického pole a v místě reakce se opět vytvoří precipitační linie. Tato technika byla použita pro stanovení potravních zdrojů *P. papatasi*. Vzorky byly testovány proti 8 specifickým protilátkám, přičemž 99,5 % testovaných samic bylo pozitivní na lidské protilátky (Morsy *et al.*, 1993).

4.1.2 ELISA

Průlomovou metodou pro identifikaci nasáté krve se stala ELISA (Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay). Tato technika, vyvíjená v průběhu šedesátých let a publikovaná v roce 1971 (Engvall & Perlmann, 1971 podle Lequin, 2005) se stala brzy populární v mnoha vědních oborech (Lequin, 2005). Nejběžněji se ELISA využívá k diagnostice lidských i zvířecích infekcí a hojně je také využívána pro kontrolní testy kvality v mnoha průmyslových odvětvích. Jedná se o imunoenzymatickou reakci, sloužící k detekci antigenu nebo protilátek v závislosti na tom, který z partnerů reakce je studovaný. Pro reakci je vždy potřeba nejméně čtyř účastníků: antigenu, protilátky, konjugátu a substrátu, přičemž na protilátku nebo antigen je zároveň kovalentně navázán enzym (Washino & Tempelis, 1983). Enzym slouží jako katalyzátor chemické přeměny substrátu, ze kterého vzniká barevný produkt. Principem reakce je využití dvou zásadních vlastností protilátek, jejich schopnosti vázat se ochotně na plastové povrchy a vázat enzymy na své Fc fragmenty. Standardní postup reakce tedy probíhá následovně: v prvním kroku se protilátka váže na dno jamek titrační destičky, poté se k protilátce přidá antigen (vzorek) a dochází ke specifické vazbě antigen-protilátka, po inkubaci a odmytí nenavázaného antigenu se do jamek přidá konjugát (druhá protilátka) s kovalentně vázaným enzymem, následuje opět inkubace a odmytí a v posledním kroku před vyhodnocením výsledků se do reakce přidá substrát, který je v katalyzované reakci přeměněn na barevný produkt (WHO, 1976). Vyhodnocení produktu probíhá spektrofotometricky. Při určování hostitelů z nasáté krve nabídla metoda ELISA hned několik výhod oproti dříve používaným postupům. Prokazovala mnohem vyšší citlivost i specifitu, a tudíž nabízela přesnější výsledky a navíc umožnila automatizovaný postup (Washino & Tempelis, 1983). Další výhodou i z dnešního pohledu je snadné a rychlé provedení celé metody, na druhou stranu značnou nevýhodu představuje nutnost mít k dispozici specifické protilátky všech potencionálních hostitelů. ELISA byla použita pro identifikaci krevních zdrojů v mnohých studiích, zabývajících se potravními návyky hematofágních členovců, a to včetně flebotomů. Z tohoto důvodu zde neuvádím kompletní přehled prací, ale pouze výběr reprezentativních příkladů.

Prvním příkladem je práce zkoumající hostitelské preference flebotomů ve střední Itálii. Tato oblast se stále více potýká s přenosem psí leishmaniózy, jejíž výskyt se zde velice rozšířil (Maroli *et al.*,

2008). Terénní práce byly prováděny v kopcovitém vnitrozemí regionu Marche a sběry byly zejména ze dvou lokalit. Nasáté samice byly dle barvy krve ve střevě rozděleny do tří skupin (čerstvě nasáté, střední doba trávení a pozdní doba trávení) a podrobeny ELISA testu za účasti sedmi specifických protilátek. Druhá identifikace jedinců z terénu, která předcházela samotné analýze nasáté krve, přispěla k mapování výskytu *P. perniciosus*. Navíc se díky analýze krve ukázalo, že *P. perniciosus* a *P. perfliewi*, jakožto hlavní přenašeči psí leishmaniózy v oblasti, jsou potravními oportunisty, což může mít souvislost s rozšířením nemoci do předměstí a měst (Bongiorno *et al.*, 2003). Dalším příkladem je identifikace hostitelů flebotomů z rodu *Lutzomyia* v Brazílii. Sběry byly prováděny v obci Governador Valadares, která je prokázaným ohniskem kutánní i viscerální leishmaniózy. Nejčastějšími druhy přítomnými ve vzorcích byly *L. longipalpis* a *L. cortelezzi*. Krev z nasátých samic těchto druhů byla testována pomocí ELISA testu proti čtyřem hostitelským protilátkám. Výsledky poukázaly na značnou preferenci slepic jako hostitelů. Slepice jsou v této oblasti hojně chovány a hostitelská preference flebotomů zvyšuje riziko styku s dalšími domácími zvířaty a člověkem (Tanure *et al.*, 2015). Posledním příkladem je výzkum fenologie a potravních preferencí *P. perniciosus* v endemické oblasti psí leishmaniózy v provincii Roma v Itálii. Studie mimo jiné testovala i sezónní výskyt flebotomů v letech 2002 a 2003 v této oblasti a prokázala, jak velký dopad mají změny počasí. Prudké deště v roce 2002 pravděpodobně způsobily velký pokles v hustotě flebotomů v následujícím roce a zároveň stouplo zastoupení druhu *P. perniciosus*, což je dle autorů zřejmě způsobeno jeho velkou ekologickou plasticitou. Testování nasáté krve z chycených samic pomocí imunoenzymatické reakce potvrdilo potravní oportunismus tohoto druhu a zároveň neprokázalo preferenci k psím hostitelům (Rossi *et al.*, 2008).

ELISA našla hojné uplatnění při analýze krevních zdrojů zejména u flebotomů a také komárů (Jansen *et al.*, 2009; Massebo *et al.*, 2015; Mwangangi *et al.*, 2003). Jinými krevsajícími členovci, pro které se této imunoenzymatické reakce využilo, jsou například ovádi (Muzari *et al.*, 2010) nebo muchničky (Hunter & Bayly, 1991).

4.2 DNA detekční metody

Metody založené na detekci a rozpoznávání nukleových kyselin z nasáté krve přinesly odpovědi na dosud nezodpovězené otázky, týkající se potravních preferencí a ekologického chování krevsajících členovců, neboť ve velké míře zvýšily citlivost a specifitu identifikace (Kent, 2009). Pro účely identifikace se používají různé genetické markery, které se ovšem ve vzorku nacházejí pouze v omezeném množství, které by nebylo dostačující. Z tohoto důvodu je nutné zvýšit počet studovaných sekvencí a odstranit nežádoucí úseky.

Zvýšení počtu námi studovaných sekvencí neboli amplifikace se provádí pomocí polymerázové řetězové reakce, PCR (Polymerase Chain Reaction), jež je základem všech identifikačních metod

založených na detekci DNA. Techniku PCR zdokonalil a uvedl do praxe americký chemik Kary Banks Mullis roku 1983 (Bartlett & Stirling, 2003), za což získal roku 1993 Nobelovu cenu za chemii. Tato technika umožňuje získat kopie specifických sekvencí bez klonování ve vektorech díky cyklicky se opakující enzymové syntéze DNA s účastí DNA polymerázy. Požadované sekvence jsou ohraničeny z obou stran specifickými primery (krátké řetězce nukleových kyselin, sloužící jako počátky replikace), které se váží na protilehlé řetězce DNA proti sobě a syntéza tudíž může běžet obousměrně. Pro potřeby PCR se využívá termofilních polymeráz, které nedegradují ve vysokých teplotách nutných v jednotlivých fázích reakce. Tyto DNA polymerázy jsou získávány z termofilních organismů, například z bakterie *Thermus aquaticus*, která poskytuje tzv. *Taq* termofilní DNA polymerázu (Saiki *et al.*, 1988), jež je pro PCR nejhojněji využívána. Značnou výhodou PCR je fakt, že dokáže amplifikovat nukleovou kyselinu z velice malého vzorku. Principem metody je cyklické opakování třech teplotně odlišených fází, přičemž po každém cyklu se počet studovaných sekvencí zvyšuje exponenciálně. První fází je denaturace molekul nukleových kyselin, což se děje pomocí rozrušování vodíkových můstků za teploty 91-95 °C. Ve druhé fázi dochází k připojení specifických primerů na studované úseky a k oddělení řetězců DNA. Každý primer má své teplotní optimum, ale obecně se tyto reakce dějí v teplotách mezi 30 a 65 °C. V poslední fázi cyklu nastává samotná syntéza nových řetězců pomocí termofilní DNA polymerázy za teplot v rozmezí 58 až 72 °C (Vosberg, 1989). Teploty jednotlivých fází jsou automaticky regulovány pomocí přístroje, tzv. termocykleru, ve kterém proces probíhá. Počet cyklů se většinou pohybuje od 25 do 35 v závislosti na množství požadované sekvence v počátečním vzorku.

PCR je využívána v mnoha vědeckých odvětvích s různými nároky na konečné produkty, proto vznikla celá řada variant, upravených podle počátečního materiálu či koncového produktu. Mnoho z nich bylo využito i pro identifikaci nasáté krve hematofágních členovců.

4.2.1 Sekvenační analýza

Amplifikované úseky nukleových kyselin jsou v následujícím kroku nejčastěji předmětem sekvenace. Jedná se o komplex biochemických metod, jehož výsledkem je pořadí nukleových bází v dané části genomu, které jsou následně porovnávány s dostupnými online databázemi a přiřazovány k živočišným druhům. Využitelnost jednotlivých genů se často odvíjí od jejich množství v počátečním materiálu a také od pokrytí genových databází.

Nejčastěji jsou pro účely identifikace potravních zdrojů využívány mitochondriální geny, které se vyskytují ve vzorcích v hojném počtu a pro něž mají bohaté pokrytí genové databáze. Preferovaným mitochondriálním markerem je gen pro cytochrom *B* (*cytB*). *CytB* je proteinová podjednotka ubichinon c cytochrom reduktázy, která je součástí komplexu III dýchacího řetězce v mitochondrii (Esposti *et al.*, 1993). Jinou variantou, využívající mitochondriálních genů, je identifikace na základě genu pro podjednotku I cytochrom c oxidázy (*COI*). Mitochondriální *COI* gen je zároveň základním markerem

taxonomické techniky DNA barcodingu. Tato dnes běžně používaná technika využívá sekvenačního porovnávání fragmentu tohoto genu pro druhovou identifikaci různých taxonomických skupin napříč říši organismů (Hebert *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu je k dispozici velké množství referenčních sekvencí v online databázích, včetně specializované databáze Barcode of Life Data System (Ratnasingham & Hebert, 2007), které je možné využít i při analýze nasáté krve. Mitochondriální geny jsou obecně spolehlivými a často využívanými markery pro analýzu krevních zdrojů, nicméně existují i varianty, využívající jaderné geny nebo ribozomální RNA geny (Kent, 2009). Pro identifikaci krve pomocí jaderných genů se využívají takové geny, které se nachází v jádře pouze v jedné kopii. Díky tomu se pracuje pouze s malým množstvím počátečního materiálu, u savčích hostitelů sníženým i tím, že mají bezjaderné erytrocyty (Abbasi *et al.*, 2009). I přes tato omezení lze pro zjišťování hostitelských zdrojů využít např. jaderný gen pro prepronociceptin (*PNOC*). V minulosti byl totiž jedním z genů, použitých v rozsáhlé studii fylogeneze různých skupin savců (Murphy *et al.*, 2001), díky čemuž se nabízí řada referenčních sekvencí pro mnoho druhů. Jeho využití jako genetického markeru při zjišťování původu nasáté krve navrhl Haouas při určení rezervoárových zvířat leishmaniózy z vektorů (2007). Využití jiných jaderných genů při identifikaci krevních zdrojů naopak nedostatečné pokrytí genovými databázemi znesnadňuje (Kent, 2009). Výjimkou je použití jaderného genu pro $\beta 2$ -mikroglobulin, který byl využit při identifikaci brazilských primátů, kteří byli ve studované oblasti pozitivní na *Plasmodium* z nasáté krve komárů (*Anopheles*) (Figueiredo *et al.*, 2017). Ribozomální geny, jsou vysoce konzervovanými geny, které lze opět využít pro identifikaci nasáté krve. Používán je ribozomální gen pro malou ribozomální podjednotku 18S rRNA a geny pro mitochondriální ribozomy 12S rRNA a 16S rRNA.

Cytochrom *B* je u flebotomů nejčastěji využívaným genetickým markerem pro studium krevních zdrojů. Výhodou této varianty je vysoká citlivost techniky a zároveň nejširší pokrytí genových databází. Velké množství prací, které se zabývají potravními preferencemi a krevními zdroji flebotomů, také používá techniku PCR a následné sekvenace *cytB*. Z tohoto důvodu nepodávám kompletní přehled všech publikovaných prací, ale pouze výběr několika příkladů studií, které metodu využily. Jedním z takových příkladů je výzkum ekologických nik a hostitelů flebotomů z ohniska viscerální leishmaniózy v čínském Sečuánu. Flebotomové pocházeli z lokality národního parku Jiuzhaigou a jednalo se výhradně o druh *Phlebotomus chinensis*, který je hlavním vektorem viscerální leishmaniózy na území Číny. Ve studované oblasti se dodržováním ochranných opatření podařilo snížit přenos viscerální leishmaniózy a studie si kladla za cíl zmapovat aktuálnější ekologickou situaci. Výsledkem bylo zjištění, že se flebotomové v dané oblasti dokázali adaptovat na různé ekologické niky (jeskyně, králíkárny, chlévy apod.) a velké spektrum hostitelů a tudíž by bylo vhodné zvážit variantu plošnějšího sprejování insekticidy v okolí lidských vesnic (Chen *et al.*, 2016). Dalším příkladem je identifikace krevních zdrojů flebotomů z jižního Portugalska, z regionu Algarve, které je endemickým ohniskem zoonotické

leishmaniózy způsobené *Leishmania infantum*. Jedním z testovaných druhů byl i *Phlebotomus perniciosus*, u kterého se díky identifikaci potvrdila jeho role potravního oportunisty, což může mít značný vliv na udržení leishmaniózy v této oblasti (Maia *et al.*, 2015). Ve Španělsku bylo sekvenování *cytB* použito pro určení krevních zdrojů opět druhu *Phlebotomus perniciosus*, jakožto hlavního vektora *Leishmania infantum* v západním Středomoří. Identifikace hostitelů z nasáté krve a DNA detekce leishmání uvnitř vektorů přispěla k lepšímu pochopení cyklu onemocnění v ohnisku na jihozápadě Madridu (Jiménez *et al.*, 2013). Mitochondriální *COI* gen byl využit ve velké studii krevních zdrojů komárů, tiplíků, flebotomů, krevsajících ploštic i klíšťat. Jednalo se o metodickou studii, která se snažila o vytvoření univerzální metody pro určování hostitelů krevsajících členovců na základě DNA bardodingu. Autoři se snažili o vytvoření jednoho páru primerů s univerzálním kódujícím (forward) primerem pro eukaryota a specifickým antikódujícím (reverse) primerem pro obratlovce. Úseky genu byly amplifikovány odstupňovanou (Nested) PCR a bylo identifikováno až 40 hostitelů, nikoli na druhové úrovni (Alcaide *et al.*, 2009).

Molekulární identifikaci krve na základě sekvenace jaderného *PNOC* genu u flebotomů poprvé navrhl a testoval Haouas (2007). Metoda, její specifita a senzitivita, byla nejprve testována na experimentálně nasátých samicích na lidech a následně na samicích chycených ve volném prostředí. Metoda se ukázala jako další možná varianta pro stanovení potravních zdrojů krevsajících členovců (Haouas *et al.*, 2007). Ve studii z oblasti Adrianópolis v Paraná šlo opět o využití amplifikovaných a osekvenovaných úseků pro jaderný *PNOC* gen za účelem identifikace nasáté krve. Zde, v ohnisku kutánní leishmaniózy, byli identifikováni hostitelé *Lutzomyia intermedia*. Jednalo se o první studii využívající *PNOC* gen k identifikaci krevních zdrojů u flebotomů v Latinské Americe. Studie navíc zjistila, že pomocí této metody se dá nasátá krev u druhu *Lutzomyia intermedia* identifikovat až 24 hodin po sání (Baum *et al.*, 2015). Posledním příkladem využití jaderného *PNOC* genu je identifikace hostitelů flebotomů v tuniském regionu Métlaou, které je ohniskem zoonotické kutánní leishmaniózy. Odchycené samice byly na základě stupně trávení rozděleny do tří skupin a byla porovnána senzitivita *PNOC* genu v závislosti na stupni degradace krve. Procento detekovatelné DNA klesalo v závislosti na stupni trávení, v první skupině (čerstvá krev) bylo 100 %, u druhé skupiny (tmavá krev ve střevě) bylo 53,5 % a v případě třetí skupiny (hnědá trávenina) 0 %. Navíc zde byla poprvé detekovaná myš DNA v jedné z nasátých samic *Sergentomyia minuta*, což otevřelo otázky možného zapojení tohoto druhu do přenosu leishmání v této oblasti (Jaouadi *et al.*, 2013). Pro jednu studii lze samozřejmě využít více genetických markerů než pouze jeden. Při studiu míry antropofility u flebotomů ze severní Kolumbie byly pro identifikaci použity sekvence jak pro *PNOC*, tak pro *cytB*. *PNOC* gen se projevil jako nedostatečný pro samostatnou identifikaci, ale v kombinaci s *cytB* doplňoval některé užitečné informace, zejména o vícehostitelském sání. Krom jiného výzkum poukázal na dva druhy z rodu *Lutzomyia* (*L. micropyga* a *L. atroclavata*), které byly poprvé detekovány jako antropofilní, což by

mohlo mít velký význam v přenosu leishmanióz v této oblasti (Paternina *et al.*, 2016). Využití ribozomálních genů pro identifikaci nasáté krve u flebotomů není zcela tradiční možností. Byly použity pouze v jediné studii, zkoumající potravní preference flebotomů a komárů na území Izraele, jakožto vektorů leishmanióz a viru západonilské horečky. Zde byly pro identifikaci použity dva mitochondriální geny pro ribozomy 12S rRNA a 16S rRNA. *Phlebotomus sergenti*, který je nejdůležitějším přenašečem kutánní leishmaniózy v Izraeli, vykazoval dle identifikací vysokou preferenci k damanům (*Hyrax*) jako hostitelům, damani jsou zároveň nejčastějšími rezervoárovými zvířaty na tomto území (Valinsky *et al.*, 2014).

Celkově tedy pro identifikaci krevních zdrojů flebotomů bylo použito prozatím pět genů. Nejčastěji využívaným genem s velice dobrým pokrytím genové databáze je mitochondriální *cytB*, jeho alternativou či doplňkovým markerem je jaderný *PNOC* gen, který byl použit pouze v malém množství prací. Zcela výjimečnou variantou je použití mitochondriálních genů pro ribozomy 12S rRNA a 16S rRNA, které byly využity pouze jednou (Paternina *et al.*, 2016). Jednou byl také využit mitochondriální *COI* gen, a to pouze v metodické studii (Alcaide *et al.*, 2009). Výběrem vhodného genetického markeru pro analýzu můžeme zvýšit pravděpodobnost úspěšného určení hostitele, neboť v průběhu trávení krev stále více degraduje a určování se stává obtížnějším. Úspěšnost metod lze ovlivnit i vhodným výběrem uchování a ochrany vzorků před samotnou identifikací. Během manipulace se vzorkem může dojít k jeho znehodnocení v důsledku slunečního a světelného záření, oxidace, degradačními vlivy hydrolýzy nebo činností nukleáz. Možností ochrany vzorků je jejich vysušení, skladování při teplotách kolem -20 °C, uložení celých těl do etanolu nebo nasátí krve z trávicího traktu vypitvaného členovce do filtračního papíru (Reeves *et al.*, 2016).

Sekvenační analýzy se v současnosti hojně využívají nejen u flebotomů, ale prakticky u všech skupin hematofágních členovců. Z výše uvedených důvodů jsou preferovanými markery především mitochondriální geny. Sekvence genu pro mitochondriální *COI* byla například použita pro stanovení krevních zdrojů u klíšťat (*Ixodida*) (Garipey *et al.*, 2012) i komárů (*Culicidae*) (Crabtree *et al.*, 2013). Pro zpřesnění identifikace bylo opakovaně využito kombinace sekvencí obou mitochondriálních genů *cytB* i *COI*, např. při studii potravních preferencí u much tse-tse (*Glossina*) (Muturi *et al.*, 2011) nebo tiplíků (Pettersson *et al.*, 2013). Sporadicky využívaný jaderný *PNOC* gen se vedle flebotomů uplatnil pouze u tiplíků, a to ve třech studiích. Prvně se pro tento genetický marker autoři studie rozhodli z důvodu možné koamplifikace hostitelské a vektorové DNA (Ninio *et al.*, 2011), s čímž se setkala práce určující krevní zdroje komárů na základě genů *COI* a *cytB* (Townzen *et al.*, 2008). *PNOC* gen se totiž na rozdíl od genu pro *cytB* ve vektorech nenachází, a proto jeho koamplifikace není možná. Další dvě studie využívali dvou genetických markerů, genu pro prepronociceptin i pro cytochrom B. V jednom případě šlo o jejich porovnání (Hadj-Henni *et al.*, 2015) a druhém sloužil *PNOC* gen pro ověření výsledků *cytB* (Slama *et al.*, 2015). Využití jaderného genu pro prepronociceptin (*PNOC*) komplikuje to, že genové

databáze nemají oproti mitochondriálním genům ani zdaleka takové pokrytí a referenční sekvence pro některé skupiny potenciálních hostitelů zcela chybí. Navíc v současnosti používané primery pro jeho amplifikaci nerozpoznávají ptačí ani plazí DNA (Slama *et al.*, 2015).

4.2.2 Multiplex PCR

Mnohonásobná (anglicky Multiplex) PCR je variantou PCR, která dokáže amplifikovat několik genů najednou v jedné reakční směsi. Prvně byla použita v roce 1988 pro detekci delece v genu pro dystrofin (Chamberlain *et al.*, 1988) a i dnes je běžně využívána v lékařské diagnostice. Oproti klasické PCR, kdy je do vzorku přidán jeden specifický pár primerů, se zde přidá několik párů primerů komplementárních k několika specifickým sekvencím. Výsledkem jsou tedy amplikony většího množství studovaných úseků genomu (Henegariu *et al.*, 1997). Mnohonásobná amplifikace se využívá pro sledování změn v rozsáhlých oblastech DNA, k vnitřní kontrole amplifikovaného vzorku nebo pro studium různých segmentů v genomu. Oproti amplifikaci za účelem sekvenační analýzy je mnohonásobná amplifikace cenově výhodnější, neboť výsledky jsou detekovány pomocí gelové elektroforézy, tudíž zde nejsou nároky na přístrojové vybavení a reagentie pro sekvenování. Na druhou stranu značnou nevýhodou je nutná empirická optimalizace reakčních podmínek krok po kroku. Pro identifikaci krevních zdrojů je tato metoda použitelná zejména tehdy, když se vektor setkává pouze s omezeným počtem hostitelů, nebo pokud nejsou nutné výsledky na úrovni druhu, ale jsou žádané širší taxonomické výsledky (Kent, 2009). Tato technika nám umožňuje detekovat více krevních zdrojů z jednoho jedince.

Příkladem práce, kdy se předpokládalo, že se vektor setkává pouze s omezeným počtem hostitelů, je identifikace krve z nasátých samic flebotomů z oblasti Valle Hermoso v Ekvádoru, kde se nachází několik ohnisek kutánní leishmaniózy. Identifikace probíhala v několika po sobě jdoucích krocích, v prvním kroku byly pomocí PCR amplifikovány oblasti pro *cytB*. Vzorky, které byly pozitivní na savčí krev, byly následně amplifikovány i pro jaderný *PNOC* gen. Pozitivní savčí vzorky byly také předmětem mnohonásobné PCR, kde se porovnával opět gen pro *cytB*, a to lidský a geny epidemiologicky významných zvířat, jako jsou psi, krávy a prasata (Anaguano *et al.*, 2015). Jednalo se o vůbec první výzkum potravních zdrojů flebotomů na území Ekvádoru. Dalším případem použití mnohonásobné PCR u flebotomů je identifikace potravních zdrojů experimentálně nasátých samic a samic chycených ve městě Piauí v Brazílii, které je prokázaným ohniskem psí i lidské viscerální leishmaniózy. Práce testovala metodu mnohonásobné PCR a cílem bylo identifikovat možné hostitele *Lutzomyia longipalpis*, jako důležitého přenašeče *Leishmania infantum chagasi* v této oblasti. U experimentálně nasátých samic se metoda ukázala být citlivá i 48 hodin po sání na člověka a z výsledků terénních vzorků je patrné, že preferovaným hostitelem v periurbánních oblastech je slepice, což může zvyšovat riziko přenosu leishmaniózy (Sant'Anna *et al.*, 2008).

Použití multiplex PCR techniky pro identifikaci savčích potravních zdrojů u hematofágních členovců navrhl Kent & Norris ve své práci zabývající se studiem krevních zdrojů u komárů z rodu *Anopheles*. Pro identifikaci použili univerzální nekódující (reverse) primer pro obratlovčí *cytB* a pět specifických kódujících (forward) primerů, které odlišily pět hlavních afrických hostitelů tohoto hmyzu (Kent & Norris, 2005). Ngo & Kramer zase navrhl specifické primery, odlišující čtyři ptačí řády a tento protokol testoval a využil pro identifikace krve u nasátých komárů (Ngo & Kramer, 2003). Obě tyto práce jsou základem mnohých studií, jež se zabývají identifikací krevních zdrojů.

Mnohonásobná PCR je obecně často využívaná metoda i u jiných krevsajících členovců. Příkladem jejího použití je identifikace hostitelů tiplíků (*Culicoides*), přenašečů významných zvířecích infekcí (Garros *et al.*, 2011). Jiným příkladem je studium disperzity bodalky stájové (*Muscidae*), která byla zjišťována za pomoci identifikace nasáté krve za použití mnohonásobného PCR (Pitzer *et al.*, 2011).

4.2.3 QPCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce neboli real-time PCR je variantou, která opět stojí na klasické PCR amplifikaci, ale navíc umožňuje přímou kvantifikaci sledovaných PCR produktů během reakce. Principem je amplifikace studovaných úseků DNA, které je možné v průběhu reakce detekovat třemi mechanismy, lišícími se použitím fluorescenčních prvků. První možností je použití interkalačního barviva, které se nespecificky váže na jakoukoli dvouřetězcovou DNA. Dalšími variantami detekce je ohraničení studované sekvence fluorescenčními primery, nebo označení fluorescenčně značenou sondou, komplementární ke studovanému úseku, která je umístěna v polovině studované sekvence. Světlo emitované z excitovaného fluoroforu je detekováno v průběhu každého cyklu reakce v termocycleru, který je pro tuto variantu PCR vybavený navíc i optickým zařízením. Výhodou této metody je již zmíněná možnost kvantifikace počátečního materiálu v reálném čase a také vysoká specifita a citlivost. Oproti tomu, nevýhodou je vysoká pořizovací cena zařízení i fluorescenčně značených primerů a sond (Kent, 2009).

Tato vysoce sensitivní varianta PCR byla použita pro identifikaci krevních zdrojů u hematofágních členovců. Pro identifikace nasáté krve u flebotomů jde o jedinou studii, v níž bylo použito real-time PCR s šesti páry specifických primerů, které byly navrženy na základě dostupných sekvencí *cytB* v genové databázi. Kvantifikované amplikony byly detekovány pomocí interkalačního fluorescenčního barviva SYBR Green, které emituje signál na základě vazby na menší žlábek dsDNA. Metoda se ukázala být velice citlivá k určování nasáté krve, zvláště pak při identifikaci experimentálně nasátých samic na krysách (*Rattus rattus*), kdy se podařilo identifikovat zdroj i 5 dní po sání (Sales *et al.*, 2015).

Dalším příkladem využití této metody je identifikace krve na základě sekvencí pro mitochondriální gen pro 18S rRNA k určování hostitelů krevsajících zákeřnic (*Triatominae*), jakožto

vektorů parazita *Trypanosoma cruzi* v Mexiku. Sada primerů, která byla navržena pro tuto studii se ukázala být vhodná pro savce, ptáky i plazy, a to během jedné reakce. Real-time PCR se projevila jako rychlá, přesná a reprodukovatelná metoda pro určování hostitelů krevsajících zákeřnic (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2013). Při studiu ekologie a koloběhu moru ve východní Africe byl vyvinut test mnohonásobné kvantitativní PCR pro identifikaci krevních zdrojů blech (*Siphonaptera*), které jsou vektory tohoto onemocnění. Dva unikátní sety byly navrženy pro identifikaci možných hostitelů z různých oblastí východní Afriky. Díky experimentálně nasátým blechám se zjistilo, že metoda je schopna identifikovat krev až 72 hodin po krmení a že detekčním limitem metody je množství 1 pg DNA. Metoda přinesla cenné informace o zvířatech, které mohou být zapojeny do přenosu morové nákazy na území východní Afriky (Woods *et al.*, 2009).

4.2.4 Analýza heteroduplexů (HDA)

Heteroduplex je specifický útvar, vzniklý propojením dvou jednořetězcových vláken DNA, přičemž vlákna pochází ze dvou různých molekul. Z tohoto důvodu splňují pouze částečnou komplementaritu bází. V místech, která jsou komplementární vznikají tzv. homoduplexy a v nekomplementárních místech již zmíněné heteroduplexy (Boakye *et al.*, 1999). Zkoumaný gen je amplifikován PCR a vzniklé amplikony jsou podrobeny denaturaci ve vysokých teplotách. Denaturovaná vlákna spolu za postupného snižování teploty hybridizují za vzniku homoduplexů a hybridních molekul DNA, heteroduplexů. Principem analýzy těchto hybridních molekul je poté rozdílná mobilita dsDNA na elektroforetickém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. Výsledky jsou vizualizovány barvivem, které se váže na DNA, pod UV světlem. Analýza heteroduplexů (HDA) se ukázala být užitečnou metodou pro detekce mutací, čímž našla uplatnění zejména v lékařské diagnostice (Velasco *et al.*, 2007). HDA je velice specifickou a sensitivní metodou, která dokáže analyzovat více vzorků v jednom kroku. V případě identifikace krevních zdrojů se předpokládá, že dokáže rozlišit a identifikovat i vícehostitelská sání (Lee *et al.*, 2002). Na druhou stranu se jedná o laboratorně náročnou metodu vyžadující celkem rozsáhlé technické školení. V případě, že v testovaných vzorcích nevznikají heteroduplexy, nebo nejsou dobře identifikovatelné, musí být vzorek podroben následné sekvenaci pro získání relevantních výsledků. Překážkou této metody může být i vnitrodruhová specifita studovaných sekvencí (Lee *et al.*, 2002), omezený počet referenčních vláken a obtížná interpretace výsledků získaných na elektroforetickém gelu.

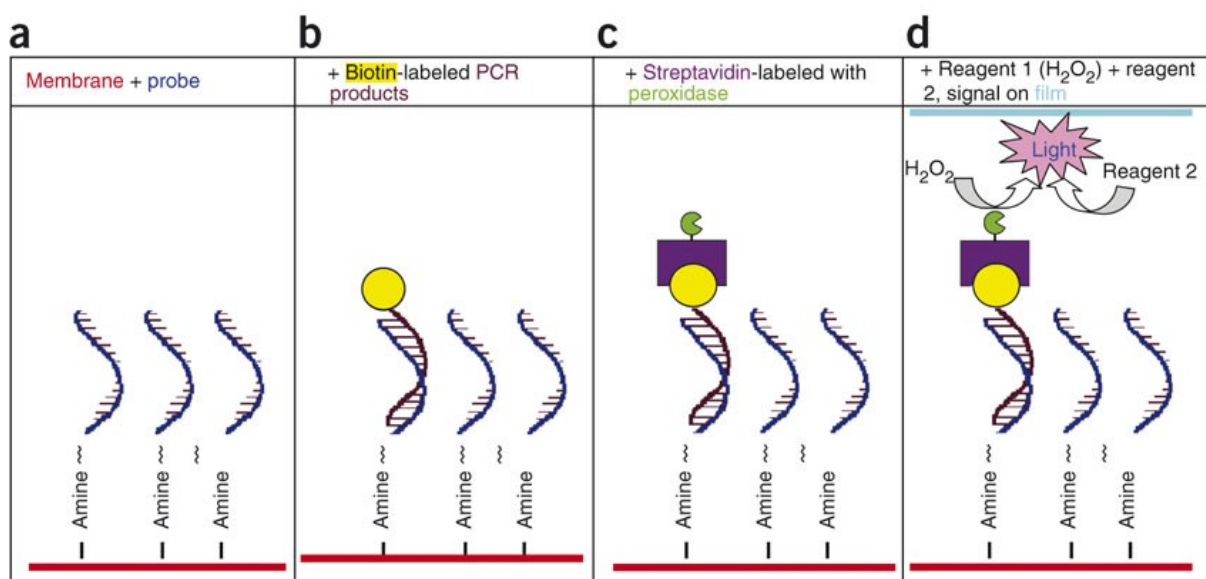
Dle dostupných informací nebyla tato metoda použita pro identifikaci nasáté krve u flebotomů, ale pouze u jiných skupin hematofágních členovců. Její využití pro určování hostitelských zdrojů bylo navrženo na příkladu afrických muchniček (*Simuliidae*) a glosin (*Glossidinae*). Metoda byla založena na amplifikaci sekvencí pro *cytB*, které byly následně denaturovány a hybridizovány s referenčními vlákny. Mobilita heteroduplexů byla měřena na polyakrylamidovém gelu a vizualizována pod UV světlem,

přičemž DNA produkty byly barveny ethidium bromidem. U experimentálně nasátých muchniček bylo zjištěno, že metoda je senzitivní k lidské krvi i 72 hodin po sání. Vzorky krve získané z glosin chycených v terénu byly opět podrobeny analýze heteroduplexů a také přímé sekvenaci. Obě metody potvrdily, že běžným hostitelem afrických glosin v oblasti Pobřeží slonoviny jsou domácí prasata (Boakye *et al.*, 1999). PCR-HDA se v následujících letech stala běžně využívanou technikou pro identifikaci krevních zdrojů u krevsajících zákeřnic. Jako příklad uvádím studii potravních zdrojů triatom v Bolívii, kde tento druh zákeřnic přenáší parazita *Trypanosoma cruzi*, jež způsobuje Chagasovu nemoc. Výzkum měl odhalit interakce mezi koloniemi *Triatoma infestans* z divoké přírody a urbánních oblastí a jejich dopad na boj s těmito vektory a Chagasovou chorobou. Vzorky krve nasátých zákeřnic byly podrobeny analýze heteroduplexů a přímé sekvenaci *cytB*. Z výsledků bylo patrné, že divoké triatomy se krmí i na hostitelích z urbánních oblastí a mohou se tedy křížit s urbánními koloniemi a vytvářet tak rezistentní populace vůči insekticidům. To by mohlo být obtížnou překážkou při redukci vektorů Chagasovy choroby (Buitrago *et al.*, 2016).

Další skupinou hematofágních členovců, u které našla PCR-HDA uplatnění pro identifikaci krevních zdrojů, jsou komáři. Příkladem je výzkum potravního chování komárů (*Culicidae*) v Queensu na území amerického New Yorku. Zde se některé druhy komárů uplatňují jako přenašeči Západonilské horečky a studium potravních zdrojů je jedním z prostředků, jak proti přenosu bojovat. Krev izolovaná z terénních vzorků byla analyzována pomocí ELISA testu a krev pocházející z ptačích hostitelů byla podrobena amplifikaci a analýze heteroduplexů pro zjištění druhové příslušnosti. Z výsledků je patrné silné ornitofilní chování druhů *Culex pipens* a *Culex restuans* a také potravní oportunismus ve výběru hostitelských druhů (Apperson *et al.*, 2002).

4.2.5 PCR RLB Hybridizace

Zcela odlišnou metodou je Reverse Line-Blot hybridizace, kdy amplikony vzniklé při PCR hybridizují na pevném povrchu. Tato metoda byla vyvinuta a i dnes je běžně používána pro detekci mutací způsobujících mnohé lidské choroby (Gold, 2003). Oproti klasické PCR jsou zde použity biotinem značené primery, které ohraničují studovanou sekvenci. V prvním kroku reverzní hybridizace je soubor aminově značených oligonukleotidových sond kovalentně navázán na karboxylem aktivovanou membránu. Následujícím krokem je hybridizace a detekce produktů PCR za účasti streptavidinu značeného peroxidázou a chemiluminiscenčního substrátu (Kong & Gilbert, 2006). Biotin vázaný na primerech umožňuje vysoce specifickou vazbu se streptavidinem, který je biotin-vazebným proteinem izolovaným z bakterie *Streptomyces avidinii*. Celý princip metody je zobrazen na obrázku číslo 2.



Obr. 1 Princip jednotlivých kroků mPCR/RLB. (a) Sondy značené aminem jsou kovalentně vázány k aktivované, negativně nabitě nylonové membráně (Biodyn C nylon membrane). (b) Amplikony značené biotinem hybridizují k sondám. (c) Streptavidin značený peroxidázou inkubuje na membráně a s vysokou afinitou se váže k PCR produktům značeným biotinem. (d) Reagencie 1 a 2 se smíchají dohromady a přidají na membránu. Reagencie 1 rozkládá peroxid vodíku a je redukována peroxidázou, tato redukční reakce způsobí oxidaci luminolu, čímž začne produkovat světelný signál, který je zachycen na film. Převzato a upraveno z: Kong & Gilbert, 2006.

Výhodou této metody je recyklace nylonové membrány, která může být použita minimálně dvacetkrát, čímž se samozřejmě snižují náklady celé reakce (Kong & Gilbert, 2006). Dále je to možnost zkoumání velkého počtu vzorků najednou a pro identifikaci krve i možná detekce více hostitelů z jednoho jedince (Abbasi *et al.*, 2009). Možnou nevýhodou je nutnost přípravy specifických značených primerů a optimalizace sond a celé reakce, která může být časově náročná. Protože se jedná o velice sensitivní metodu, musí být templáty pro RLB vysoce konzervované geny, které vykazují minimální vnitrodruhovou variabilitu (Abbasi *et al.*, 2009).

Studie zabývající se rozsáhleji použitím metody PCR RLB pro identifikaci nasáté krve flebotomů zkoumala její náročnost, výsledky, výhody i nevýhody. Identifikace byla založená na amplifikaci úseku pro *cytB*, který je vhodným genetickým markerem pro tuto metodu. RLB byla testována jak na experimentálně nasátých samicích, tak na samicích chycených a krmených ve volné přírodě. Samice *P. papatasi* byly experimentálně nasáté, přičemž hostiteli byli člověk a kuře. Byly usmrceny a podrobeny PCR v různých časech po sání, čímž se testovala citlivost metody. Z výsledků vyplývá, že *cytB* bylo možno detekovat i 96 hodin po sání. Z experimentálního sání také vyplynulo, že metoda dokáže detekovat smíšené krevní zdroje. U volně chycených samic se citlivost metody projevila ve schopnosti rozeznání pravděpodobného zdroje i v případě, kdy PCR produkt nebyl téměř patrný na gelu po elektroforéze. Při určování hostitelů volně nasátých samic se také ukázalo, že frekvence sání na více hostitelských druzích je vyšší, než se předpokládalo. Metoda se projevila jako vhodná a rychlá možnost

v případě, kdy je předpokládán omezený počet hostitelů. Naopak podle autora tuto techniku není vhodné použít v případě, že existuje velké množství potencionálních hostitelů, kteří vyžadují jednoznačnou identifikaci (Abbasi *et al.*, 2009). Příkladem použití této metody pro zjišťování potravních preferencí flebotomů je i studie z Biháru ve východní Indii, kde je přenášena viscerální leishmanióza druhem *P. argentipes*. Metoda byla opět založena na amplifikaci sekvencí *cytB*, které byly pomocí RLB přiřazeny k živočišným druhům. Pro ověření produktů PCR a věrohodnosti metody RLB bylo několik vzorků *cytB* osekvenováno se shodným výsledkem. Studie dokázala antropofilní chování tohoto druhu, ale také množství vícehostitelských sání. Výsledky také ukázaly, že pro boj s těmito vektory je nutné chránit i domácí zvířata, jež jsou běžnými hostiteli a to třeba sprejováním insekticidy (Garlapati *et al.*, 2012). Metoda byla využita také ke studiu hostitelských preferencí flebotomů z oblasti Tahtay Adiyabo v severní Etiopii, jež se potýká s viscerální leishmaniózou. Infekce je v této oblasti způsobena druhem *Leishmania donovani* a předpokládaným přenašečem je *P. orientalis*. Jedinci z terénních odchytů byli identifikováni a nasáté samice byly rozděleny do dvou skupin. Jedna skupina byla pro určení krevních zdrojů podrobena ELISA testu a u druhé skupiny byla provedena amplifikace *cytB* a RLB. Obě metody projevily vysokou citlivost ke studovaným vzorkům a jejich výsledky byly srovnatelné. PCR-RLB se ukázala být rychlejší variantou a také dokázala snadno detekovat smíšené zdroje krve. Studie přinesla další důkazy o zoofilním chování druhu *P. orientalis* a také ukázala, že se tento druh umí rychle a snadno adaptovat na nového hostitele v závislosti na nabídce prostředí (Gebresilassie *et al.*, 2015).

Tato metoda se běžně využívá pro určení hostitele i u jiných krevsajících členovců, uplatnění našla zejména u klíšťat. Byla mimo jiné použita například při výzkumu rezervoárových zvířat druhu *Amblyomma americanum* (Allan *et al.*, 2010) nebo při určování hostitelů nedospělých stádií *Ixodes ricinus* ve Španělsku (Estrada-Peña *et al.*, 2005). V obou zmíněných případech byl jako genetický marker použitý gen pro malou ribozomální podjednotku 18S rRNA.

4.2.6 PCR-RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) využívá k typizaci cílové sekvence polymorfismy v homologních genech. Nástrojem jejich detekce jsou restrikční endonukleázy, enzymy, které štěpí DNA řetězce blízko specifických rozpoznávacích sekvencí, tzv. restrikčních míst (Roberts & Murray, 1976). Homologní úseky DNA různých organismů se liší v konkrétní sekvenci a díky tomu i v přítomnosti či nepřítomnosti restrikčních míst pro různé restriktázy. Metoda PCR-RFLP na rozdíl od klasické PCR získané amplikony enzymově štěpí a výsledné restrikční fragmenty porovnává v délkové variabilitě. Běžně se využívá například k mapování genetických vazeb (Kent, 2009). Prvním krokem je tedy PCR, následovaná štěpením endonukleázami, separací štěpů pomocí elektroforézy a jejich vizualizací. Klíčovým okamžikem reakce je výběr vhodné endonukleázy či kombinace endonukleáz (Rasmussen, 2012). Nespornou výhodou

této metody je její cena. Oproti jiným modifikacím PCR se totiž výsledný produkt nesekvencuje, čímž odpadá část nákladů i drahé přístroje. Nejnákladnější položkou celé metody jsou specifické endonukleázy. Další výhodou je vcelku jednoduchý metodický postup, který nevyžaduje rozsáhlé technické školení (Rasmussen, 2012). Výhodou při použití této metody pro identifikaci krevních zdrojů je fakt, že od sebe lze odlišit druhy hostitelů, kteří se liší pouze v jednom či několika málo nukleotidech ve studované sekvenci (Kent, 2009). Na druhou stranu je při této metodě nezbytné mít předem přehled o možných hostitelích a znát jim odpovídající podobu restričních fragmentů, což zpravidla znamená vytvoření pracovní databáze.

Využití této metody pro identifikaci krevních zdrojů nasátých samic flebotomů není zcela tradiční, avšak v některých případech je její využití vhodné. Prvním případem použití byla studie v severozápadním Íránu v provincii Ardabil, jež je ohniskem viscerální leishmaniózy. Zde se využilo metody PCR-RFLP pro identifikaci pomocí dvou sekvencí obratlovčího mitochondriálního genu pro cytochrom B. Amplifikované sekvence byly štěpeny za účasti dvou endonukleáz, *Xho* I a *Hae* III. Koncové restriční fragmenty byly porovnávány elektroforeticky na agarózovém gelu a snadno od sebe odlišeny na základě dostupné databáze hostitelů (Maleki-Ravasan *et al.*, 2009). Studie zároveň porovnávala využitelnost a praktičnost tehdy inovativní metody PCR-RFLP a tradiční metody imunoenzymatického testu, ELISA. Zcela zásadní výhodou použití PCR-RFLP byla detekce více krevních zdrojů ve vzorku, což metoda ELISA neumožňovala, neboť tak malý objem krve lze testovat pouze na jeden antigen (Maleki-Ravasan *et al.*, 2009). Dalšími příklady využití této metody může být studie potravních zdrojů flebotomů v jižním Íránu, ohnisku zoonotické kutánní leishmaniózy. Zde byli pomocí metody PCR-RFLP zjištěni hostitelé několika druhů flebotomů z různých endemických vesnic v této oblasti. Účelem identifikace zdrojů bylo lepší pochopení potravních interakcí a koloběhu parazita v této lokalitě (Azizi *et al.*, 2016). Ve Španělsku bylo PCR-RFLP použito k identifikaci krevních zdrojů flebotomů, ze třech různých oblastí. Primární lokalitou byl Madrid, kde od roku 2010 prudce vzrůstá výskyt infekcí způsobených *Leishmanií infantum*. Všichni flebotomové z madridské oblasti byli určeni jako druh *Phlebotomus perniciosus* a bylo zjištěno, že preferovaným hostitelem je králík, což má velký význam v periferních oblastech Madridu, kde jsou králíci hojně chováni (González *et al.*, 2015). Dalším příkladem je výzkum z brazilského národního parku Ibitipoca v jihovýchodní části země. Zde se potýkají s přenosem *Leishmania spp.* flebotomy z rodu *Psychodopygus*, studie hodnotila bio-ekologické faktory související s potravními zdroji a přenosem infekce v této oblasti (Quaresma *et al.*, 2012).

Ukázkou využití této metody u jiných krevsajících členovců je studie zabývající se výzkumem potravních zdrojů klíšťat na území Polska, kde se uplatňují jako přenašeči bakterií *Borrelia spp.* Zde bylo nejprve využito metody odstupňované (Nested) PCR pro odhalení polymorfismů v genu pro 12S rRNA a výsledné produkty byly štěpeny restričními enzymy. Kombinace metod umožnila identifikaci

velkého množství hostitelů (Wodecka & Skotarczak, 2016). PCR-RFLP byla využita také pro stanovení potravních zdrojů u komárů (Oshaghi *et al.*, 2006) a glosin (Steuber *et al.*, 2005).

Jinou variantou klasické RFLP je T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). Metoda byla vyvinuta a poprvé použita jako nástroj pro srovnání bakteriální diverzity přírodních vzorků (Liu *et al.*, 1997) a i dnes je to její nejběžnější využití. Principem metody je navázání fluorescenčně značených primerů na studované sekvence DNA, následná amplifikace těchto úseků a štěpení pomocí restričních endonukleáz, jako při klasické PCR-RFLP (Dickie & Fitzjohn, 2007). Výsledné fragmenty jsou detekovány pomocí kapilární elektroforézy a analyzovány v sekvenátoru. Výstupem metody je graf porovnávající svítivost a délku fragmentů. Výhodou této metody je snadná reprodukovatelnost výsledků a skladování dat, nízká cena (oproti sekvenování) a potřeba pouze standardního laboratorního vybavení. Nevýhodou je nižší senzitivita než u DNA sekvenování a existují-li ve vzorku dvě různé sekvence, které sdílí jedno terminální restriční místo, ve výstupním grafu se nám zobrazí pouze jeden pík místo dvou.

Pro identifikaci krevních zdrojů byla dle dostupných informací využita metoda T-RFLP pouze jednou, a to u komárů (Meece *et al.*, 2005). Studovanou sekvencí byl 358 bp fragment mitochondriálního *cytB*. Fluorescenčně značené produkty PCR byly štěpeny čtyřmi restričními endonukleázami a velikost restričních fragmentů byla stanovena kapilární elektroforézou. Určení krevních zdrojů proběhlo srovnáním výsledků s dostupnou online databází T-RFLP fragmentů (Meece *et al.*, 2005).

4.2.7 DNA profilování

DNA eukaryotických organismů je tvořena jednak konzervativními částmi, kódujícími nejrůznější geny a pseudogeny, a jednak opakujícími se sekvencemi, vyskytujícími se v genomu s různou četností. Právě tyto tandemové repetice jsou využívány při DNA profilování. Nejvýznamnějšími skupinami tandemových repetic jsou minisatelity a mikrosatelity, které jsou využívány jako genetické markery v různých studiích (Mukabana *et al.*, 2002). Určování individua na základě profilu jeho DNA je dnes zcela běžnou praxí. Tato metoda, která byla vyvinuta jako vyšetřovací technika v kriminalistice, má dnes uplatnění v mnohých vědeckých oborech i praktických aplikacích, např. při zjišťování rodičovství nejen v soudních sporech. Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní úseky DNA, které se skládají z tandemových repetic, přičemž každá má obvykle méně než 5 bází (Bruford & Wayne, 1993). Principem metody je PCR amplifikace daného lokusu, kdy nám primery označují mikrosatelitní úsek. Amplikony jsou následně srovnány podle velikosti a podrobeny fragmentační analýze. Profilování DNA na základě mikrosatelitů je jedinou z výše zmíněných metod, která je dostatečně citlivá na to, aby identifikovala konkrétního jedince, z něhož krev pochází. Jedná se o velice

specifickou metodu, která nachází využití pouze v omezeném množství případů, neboť při většině studií potravních preferencí hematofágního hmyzu je hlavním cílem identifikace hostitele na úrovni druhu. Nebyla dosud nikdy použita u flebotomů.

Naopak u komárů byla opakovaně použita pro zjištění konkrétních lidských hostitelů z nasáté krve (De Benedictis *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2006). V prvním případě šlo o důkaz sání jednoho jedince na více lidských zdrojích a souvislosti tohoto jevu s přenosem horečky Dengue komáry druhu *Aedes albopictus*. Studie navíc pomohla osvětlit okolnosti epidemie v obci Florida v Portoriku (De Benedictis *et al.*, 2003). Ve druhém případě šlo opět o zjištění počtu lidských hostitelů jednoho jedince komára (Richards *et al.*, 2006). V severní Zambii byla analýza lidských mikrosatelitů použita ke studii kombinovaného sání na více lidských hostitelích, což je důležité pro posouzení rizika přenosu malárie na tomto území. Zároveň byla zkoumána i preference hostitelů na základě pohlaví. Více lidských hostitelů bylo determinováno, když se v jednom lokusu mikrosatelitu nacházelo 3 a více alel. Z výsledků vyplývá, že 72 % samic testovaných na lidské mikrosatelity sálo na více než jednom člověku. Zároveň se v oblasti nepotvrdila žádná výrazná preference pohlaví hostitelů (Das *et al.*, 2017). DNA profilování bylo také provedeno při studii potravního chování much tse-tse (*Glossinae*), kdy se jednalo o identifikaci individuálních kusů dobytka. Studie se mimo jiné zabývala potravní preferencí na základě stáří dobytka, kdy byla testována a potvrzena mnohem vyšší preference dospělých kusů oproti telatům, což je zřejmě způsobeno nižší mírou defenzivního chování starších jedinců (Torr *et al.*, 2001).

Obecně se jedná o výjimečně používanou, vysoce citlivou a specifickou metodu identifikace nasáté krve.

4.3 Analýza proteinů

Proteinové analýzy jsou zatím pouze málo rozšířené, i když slibují při identifikaci krve značné výhody oproti jiným kategoriím. Jednou z nich je schopnost detekovat i malé zbytky potravy, a to až měsíc po sání, nebo schopnost výsledků odolávat degradaci krve, což je překážkou ve většině používaných metod (Önder *et al.*, 2013). Žádná z metod využívající proteinové analýzy dosud nebyla použita pro identifikaci krve z nasátých samic flebotomů.

Všechny dosud publikované studie využily k analýze proteinů různé varianty hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry). Ta je založena na ionizaci chemických sloučenin, důsledkem čehož vznikají nabitě molekuly, které jsou dle poměru hmotnosti ku náboji děleny.

Analýza krevních proteinů byla pro určení hostitele opakovaně použita u klíšťat (*Ixodidae*), a to zejména z důvodu jejich odlišného průběhu trávení krve. Klíšťata totiž na rozdíl od většiny zástupců hematofágního hmyzu tráví potravu převážně intracelulárně po endocytóze. Navíc některé proteiny hostitelské krve jsou udržovány v hemolymfě, tudíž je jejich detekce možná i dlouho po úplném strávení krve (Jasinskas *et al.*, 2000). V prvním příkladu se jednalo o použití kapalinové chromatografie

s hmotností detekcí, LC-MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) k identifikaci hlavních hostitelů klíšťat *Ixodes scapularis* a *Amblyomma americanum* na základě krevních proteinů, zvláště α a β globulinů, histonů a mitochondriálních enzymů. Principem LC-MS je využití kapalně mobilní fáze pro chromatografickou separaci vzorku, před samotnou ionizací. Ionizované vzorky následně putují do hmotnostního analyzátoru a detektoru. Touto technikou se podařilo zjistit hostitele klíšťat i několik měsíců po sání. Dle autorů je jedním z hlavních důvodů úspěchu této studie přístup k rozsáhlým proteinovým databázím pro ovce, králíky a laboratorní myši, které byli při práci použity (Wickramasekara, Bunikis, Wysocki, & Barbour, 2008). I v další studii bylo využito LC-MS pro identifikaci hostitelů *Ixodes scapularis*. Zde bylo v první řadě podrobeno kapalinové chromatografii s hmotností detekcí 24 vzorků krve z hlavních hostitelů pro tvorbu pracovní databáze, která byla následně použita pro stanovení výsledků získaných pomocí LC-MS testovaných klíšťat. Hostitele se za pomoci této metody podařilo stanovit i 6 měsíců po sání (Önder *et al.*, 2013). Na základě této studie byl vypracován standardní „shotgun“ proteomický protokol (Önder *et al.*, 2014).

Proteinová analýza byla vedle klíšťat použita také u komárů, konkrétně technika MALDI-TOF MS (Matrix-assisted, laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Ta je založena na laserové ionizaci peptidů, které byly extrahovány ze vzorku, smíchány s matricí a následně vykrytalizovány na MALDI destičce. U ionizovaných molekul je poté stanoven čas letu, z kterého je vypočítán poměr hmotnosti a náboje. Metoda byla experimentálně testována u dvou druhů komárů, *Anopheles gambiae* a *Aedes albopictus*, a ukázala se být citlivá do 24 hodin po sání, ale její účinnost rapidně klesala po 36 hodinách po sání, čímž se ukázala být méně výkonná než některé DNA detekční metody. Nespornou výhodou metody ovšem zůstává její rychlost, nízká cena a snadná příprava vzorků (Niare *et al.*, 2016). Tato metoda by mohla být do budoucna užitečná i pro stanovování hostitelů flebotomů.

4.4 Analýza stabilních izotopů

Zcela odlišnou možností identifikace krve sangivorních členovců je analýza stabilních izotopů, SIA (Stable Isotope Analyses). Tato metoda slouží tradičně v ekologických studiích k mapování potravních sítí. Založena je na předpokladu, že každý hostitel má svůj specifický izotopový podpis, a že se stabilní izotopy v procesu trávení mění předpokládaným způsobem, který lze mapovat. Nejčastějšími prvky, využívanými k těmto účelům, jsou uhlík a dusík a jejich izotopy $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$. Výhodou metody v rámci identifikace krve by byla všestrannost užití a využitelnost v různých systémech vektor-hostitel. Oproti tomu největší nevýhodou metody je nutnost tvorby knihovny izotopových podpisů všech potencionálních hostitelů v dané oblasti (Gómez-Díaz & Figuerola, 2010).

Jako první SIA pro identifikaci krve navrhl Rasgon jako možnost určení hostitelů komárů i po úplném strávení krve (2008). Experimentálně nasáté i nenasáté samice *Aedes albopictus* byly

podrobeny analýze stabilních izotopů dusíku a uhlíku v různých časech po sání i po úplném strávení krve (týden po sání). Z výsledků je patrné, že poměr mezi uhlíkem a dusíkem přinesl informaci pouze o tom, zda byla samice nasátá či nikoli, oproti tomu stabilní izotop δN dokázal rozlišit mezi dvěma hostiteli, a to autorem studie a kuřetem (Rasgon, 2008). Metoda byla použita i při terénních studiích, konkrétně hostitelů blech *Oropsylla hirsuta*, které se v Severní Americe uplatňují v přenosu bakterie *Yersinia pestis* způsobující mor (Stapp & Salkeld, 2009). Tato technika nebyla nikdy použita při studiu potravních zdrojů flebotomů, ani u jiných skupin nenašla velké uplatnění a objevila se pouze ve dvou dalších studiích. S její pomocí se podařilo zjistit posledního hostitele larválního stádia *Ixodes ricinus* z nenasátých nymf v experimentálních podmínkách (Schmidt *et al.*, 2011). Znovu se analýza stabilních izotopů objevila v práci porovnávající vybrané DNA detekční metody a SIA pro identifikaci krevních zdrojů *Amblyomma americanum* napříč vývojovými stádii. SIA oproti vybraným DNA metodám byla schopna identifikovat hostitele ve všech vývojových stádiích i dospělých jedincích (Hamer *et al.*, 2015).

5. Závěr

Přenašeči šířená onemocnění (vector-borne diseases), jsou infekční choroby, jejichž nákaza je zprostředkována kontaktem přenašeče s hostitelem. Nejvýznamnější skupinou vektorů jsou hematofágní členovci, kteří patogen vpraví do těla hostitele při sání krve. Celkově tvoří přenašeči šířená onemocnění až jednu třetinu všech známých infekčních chorob (Gómez-Díaz & Figuerola, 2010). Většina jsou zoonózy, tudíž aby mohlo dojít k přenosu infekce na člověka, musí nejprve přenašeč sát na rezervoárovém zvířeti. Studium potravních návyků a hostitelských preferencí je jednou z možností, jak osvětlit koloběh infekčních onemocnění, případně umožňuje navrhnout ochranná opatření proti přenosu. Flebotomové (*Diptera:Psychodidae:Phlebotominae*) přenášejí na člověka několik infekčních onemocnění, z nichž největšího významu dosahují parazitickými prvky rodu *Leishmania* způsobované leishmaniózy, které ohrožuje téměř 350 milionů lidí po celém světě (WHO, 2010). Zároveň je v poslední době věnována zvýšená pozornost také přenosu flebovirů, o jejichž rezervoárových hostitelích máme dosud málo informací (Depaquit *et al.*, 2010).

V rámci pochopení vztahů patogen – přenašeč – hostitel byla identifikace krevních zdrojů mnohokrát provedena na flebotomech v různých částech světa. Dříve tradičně používané sérologické metody, jakými jsou precipitinový test, střetná imuno elektroforéza a imunenzymatická reakce ELISA, postupem času nahrazují citlivější a specifitější DNA detekční metody, avšak ELISA test je i dnes stále využívaným přístupem. Základem sérologických metod je specifická reakce mezi vzorkem s antigenem a specifickou protilátkou. DNA detekční metody jsou založené na amplifikaci a následném rozpoznávání určitého úseku genetické informace. To probíhá buď přímou sekvenací nebo jinými mechanismy, např. s pomocí heteroduplexů, hybridizace či restrikčních enzymů. Četností využití přímá sekvenční analýza nad dalšími metodami u flebotomů převažuje. Je přitom zajímavé, že na rozdíl od

jiných skupin hematofágních členovců při využití mitochondriálních genů spoléhá zejména na *cytB* a potenciál *COI*, což by standardního markeru druhové identifikace organismů metodou DNA barcodingu, je s výjimkou jediné studie opomíjen.

Nicméně i DNA metody mají svá omezení a limity, kterými jsou například malé množství počátečního materiálu, rychlá degradace krevních složek v rámci trávení, časová náročnost metod, nebo jejich vysoká cena. Srovnání v současnosti běžně využívaných technik pro identifikaci nasáté krve včetně jejich hlavních výhod a nevýhod je uvedeno v tabulce č.1.

Vzhledem k uvedeným omezením stávajících metod dochází k jejich dalšímu zdokonalování a k zavádění metod nových. Kategorie technik, která bude mít dle mého názoru do budoucna velký význam, je analýza krevních proteinů, i přes skutečnost, že zatím nebyla provedena při identifikaci krevních zdrojů u flebotomů. Krevní proteiny jsou v rámci tráveniny stabilnější než nukleové kyseliny a např. u klíšťat umožňují identifikaci i několik měsíců po sání (Wickramasekara *et al.*, 2008). Další možností, kam by se mohly identifikace ubírat, je analýza stabilních izotopů. I v tomto směru již bylo provedeno nevelké množství experimentů, nikdy však na flebotomech a použití je omezeno tvorbou knihovny izotopových podpisů potenciálních hostitelů.

NÁZEV METODY	VÝHODY	NEVÝHODY
ELISA	⊕ Tradiční metoda	⊖ Omezený počet výsledků
	⊕ Snadné použití	⊖ Nutnost mít k dispozici protilátky všech potencionálních hostitelů
	⊕ Standardní laboratorní vybavení	⊖ 1 vzorek lze testovat pouze na 1 protilátku
	⊕ Vysoká specifita	
Sekvenační analýza	⊕ Vysoká sensitivita i specifita	⊖ Vysoká cena
	⊕ Možnost vícehostitelská sání	⊖ Časová náročnost
Multiplex PCR	⊕ Cena, standardní přístrojové vybavení	⊖ Nutnost optimalizovat reakční podmínky
	⊕ Možnost analyzovat několik vzorků najednou	⊖ Nutnost mít k dispozici komplementární sadu primerů
QPCR	⊕ Kvantifikace počátečního materiálu	⊖ Vysoká cena zařízení a fluorescenčně značených primerů
	⊕ Vysoká sensitivita i specifita	
PCR HDA	⊕ Detekce vícehostitelských sání	⊖ Náročnost metody
	⊕ Vysoká sensitivita i specifita	⊖ Komplikace vnitrodruhovou variabilitou
	⊕ Analýza více vzorků v jednom kroku	⊖ Omezený počet referenčních vláken
PCR RLB	⊕ Nízké náklady (recyklace nylonové membrány)	⊖ Časová náročnost (příprava značených primerů a optimalizace sond)
	⊕ Analýza více vzorků najednou	
	⊕ Detekce vícehostitelských sání	
PCR RFLP	⊕ Nízké náklady, standardní přístrojové vybavení	⊖ Nutná předchozí znalost možných hostitelů
	⊕ Jednoduchý postup	
	⊕ Vysoká citlivost	⊖ Pokrytí databáze restrikčních fragmentů odpovídající všem potencionálním hostitelům
DNA profilování	⊕ Identifikace hostitele na úrovni individua	⊖ Vysoké náklady

Tabulka č.1 – Srovnání nejčastěji používaných metod pro identifikaci krevních zdrojů hematofágních členovců, důležité výhody a nevýhody.

Seznam použité literatury

Primární citace

- Abbasi, I., Cunio, R., & Warburg, A. (2009). Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome B PCR and reverse line blotting. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 9(1), 79–86.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3).
- Alcaide, M., Rico, C., Ruiz, S., Soriguer, R., Muñoz, J., & Figuerola, J. (2009). Disentangling vector-borne transmission networks: A universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PLoS ONE*, 4(9), 1–6.
- Alexander, B., & Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1), 1–18.
- Allan, B. F., Goessling, L. S., Storch, G. A., & Thach, R. E. (2010). Blood meal analysis to identify reservoir hosts for Amblyomma americanum ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 433–440.
- Anaguano, D. F., Ponce, P., Baldeón, M. E., Santander, S., & Cevallos, V. (2015). Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Tropica*, 152, 116–120.
- Apperson, C. S., Harrison, B. a, Unnasch, T. R., Hassan, H. K., Irby, W. S., Savage, H. M., Nasci, R. S. (2002). Host-feeding habits of Culex and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of Culex mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 39(5), 777–785.
- Azizi, K., Askari, M. B., Kalantari, M., Azizi, K., Askari, M. B., & Kalantari, M. (2016). Molecular detection of Leishmania parasites and host blood meal identification in wild sand flies from a new endemic rural region , south of Iran Molecular detection of Leishmania parasites and host blood meal identification in wild sand flies from a new . *Pathogens and Global Health*, 7724(November), 1–7.
- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 226, 3–6.
- Baum, M., de Castro, E. A., Pinto, M. C., Goulart, T. M., Baura, W., Klisiowicz, D. do R., & Vieira da Costa-Ribeiro, M. C. (2015). Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica*, 143, 8–12.
- Berdjane-Brouk, Z., Koné, A. K., Djimdé, A. A., Charrel, R. N., Ravel, C., Delaunay, P., Izri, A. (2012). First detection of Leishmania major DNA in Sergentomyia (Spelaeomyia) darlingi from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PLoS ONE*, 7(1), 1–5.
- Boakye, D. A., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A., & Unnasch, T. R. (1999). Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Medical and Veterinary Entomology*, 13(3), 282–287.
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., & Maroli, M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*, 88(2), 109–116.

- Brazil, R. P. (2013). The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(3), 263–264.
- Bruford, M. W., & Wayne, R. K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3(6), 939–943.
- Buitrago, R., Bosseno, M.-F., Depickère, S., Waleckx, E., Salas, R., Aliaga, C., Cohen, J. (2016). Blood meal sources of wild and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: connectivity between cycles of transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & Vectors*, 9(1), 214.
- Bull, C., & King, W. (1923). The identification of the blood meal of mosquitoes by means of the precipitin test. *American Journal of Epidemiology*, 3(5), 491–496.
- Crabtree, M. B., Kading, R. C., Mutebi, J.-P., Lutwama, J. J., & Miller, B. R. (2013). Identification of Host Blood From Engorged Mosquitoes Collected in Western Uganda Using Cytochrome Oxidase I Gene Sequences. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(3), 611–626.
- Crans, W. J. (1969). An agar gel diffusion method for the identification of mosquito blood-meals. *Mosquito News*, (29), 563–566.
- Da Rocha Nery, L. C., Lorosa, E. S., & Ramos Franco, A. M. (2004). Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6), 571–574.
- Das, S., Muleba, M., Stevenson, J., Pringle, J., Norris, J. Beyond the entomological inoculation rate: characterizing multiple blood feeding behavior and *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection in *Anopheles* mosquitoes in northern Zambia. *Parasites & Vectors*, 10(1), 45.
- De Benedictis, J., Chow-Shaffer, E., Costero, A., Clark, G. G., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2003). Identification of the people from whom engorged *Aedes aegypti* took blood meals in Florida, Puerto Rico, using polymerase chain reaction-based dna profiling. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), 437–446.
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P. E., & Peyrefitte, C. (2010). Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveillance : Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 15(10), 19507.
- Depaquit, J., Randrianambinintsoa, F. J., Jaouadi, K., Payard, J., Bounamous, A., Augot, D., Léger, N. (2014). Molecular and morphological systematics of the sandfly *Sergentomyia* (Sintonius) *clydei* Sinton, 1928 and questions about its record in the Seychelles. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 41–53.
- Dickie, I. A., & Fitzjohn, R. G. (2007). Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: A methods review. *Mycorrhiza*, 17(4), 259–270.
- Dillon, R. J., & Lane, R. (1993). Blood meal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med. Vet. Entomol.*, 7, 225–232.
- Dougall, A. M., Alexander, B., Holt, D. C., Harris, T., Sultan, A. H., Bates, P. A., Walton, S. F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*, 41(5), 571–579.

- Eldridge B.F, Edman J.D. (2004). Medical Entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods. Rev. ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2003. Str.33-37 ISBN 1-4020-1413-9.
- Esposti, M. D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., & Meyer, A. (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1143(3), 243–271.
- Estrada-Peña, A., Osácar, J. J., Pichon, B., & Gray, J. S. (2005). Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Experimental and Applied Acarology*, 37(3–4), 257–268.
- Feliciangeli, M. D. (2004). Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(1), 71–80.
- Figueiredo, M. A. P., Di Santi, S. M., Manrique, W. G., Gonçalves, L. R., André, M. R., & Machado, R. Z. (2017). Molecular identification of *Plasmodium* spp. and blood meal sources of anophelines in environmental reserves on São Luís Island, state of Maranhão, Brazil. *Parasites & Vectors*, 10(1), 203.
- Francischetti, I. M. B. (2010). Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*, 56(7), 1130–1144.
- Gariepy, T. D., Lindsay, R., Ogden, N., & Gregory, T. R. (2012). Identifying the last supper: Utility of the DNA barcode library for bloodmeal identification in ticks. *Molecular Ecology Resources*, 12(4), 646–652.
- Garlapati, R. B., Abbasi, I., Warburg, A., Poché, D. M., & Poché, R. M. (2012). Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. *Journal of Medical Entomology*, 49(3), 515–521.
- Garros, C., Gardès, L., Allène, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., & Balenghien, T. (2011). Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): Applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1103–1110.
- Gebresilassie, A., Kirstein, O. D., Yared, S., Aklilu, E., Moncaz, A., Tekie, H., Gebre-Michael, T. (2015). Species composition of phlebotomine sand flies and bionomics of *Phlebotomus orientalis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Tahtay Adiyabo district, Northern Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 8, 248.
- Gold, B. (2003). Origin and utility of the reverse dot-blot. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3(2), 143–52.
- Gómez-Díaz, E., & Figuerola, J. (2010). New perspectives in tracing vector-borne interaction networks. *Trends in Parasitology*, 26(10), 470–476.
- González, E., Gállego, M., Molina, R., Abras, A., Magdalena, M., Ballart, C., Jiménez, M. (2015). Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. *Acta Tropica*, 152, 96–102.
- Hadj-henni, L., Demeulemeester, T., Depaquit, J., Noel, P., Germain, A., Helder, R., & Augot, D. (2015). Comparison of vertebrate cytochrome b and prepronociceptin for blood meal analyses in *Culicoides*. *Frontiers in Veterinary Science*, 2(15), 1–8.

- Hamer, S. A., Weghorst, A. C., Auckland, L. D., Roark, E. B., Strey, O. F., Teel, P. D., & Hamer, G. L. (2015). Comparison of DNA and Carbon and Nitrogen Stable Isotope-Based Techniques for Identification of Prior Vertebrate Hosts of Ticks. *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 1043–1049.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J. P., Babba, H., & Ravel, C. (2007). Development of a molecular tool for the identification of leishmania reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6), 1054–1059.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–21.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Research Reports Multiplex PCR : Critical Parameters and. *BioTechniques*, 23(July), 504–511.
- Hunter, F. F., & Bayly, R. (1991). Elisa for Identification of Blood Meal Source in Black Flies (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, 28(4), 527–532.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology*, 48(C), 141–161.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N., & Thomas, C. (1988). Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23), 11141–11156.
- Chen, H., Li, K., Shi, H., Zhang, Y., Ha, Y., Wang, Y., Ma, Y. (2016). Ecological niches and blood sources of sand fly in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Jiuzhaigou, Sichuan, China. *Infectious Diseases of Poverty*, 5(1), 33.
- Ibáñez-Cervantes, G., Martínez-Ibarra, A., Noguera-Torres, B., López-Orduña, E., Alonso, A. L., Perea, C., León-Avila, G. (2013). Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in México. *Parasitology International*, 62(1), 36–43.
- Jansen, C. C., Webb, C. E., Graham, G. C., Craig, S. B., Zborowski, P., Ritchie, S. A., Van Den Hurk, A. F. (2009). Blood sources of mosquitoes collected from urban and peri-urban environments in eastern Australia with species-specific molecular analysis of avian blood meals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5), 849–857.
- Jaouadi, K., Haouas, N., Chaara, D., Boudabous, R., Gorgii, M., Kidar, A., Babba, H. (2013). Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) Bloodmeal Sources in Tunisian Cutaneous Leishmaniasis Foci: Could *Sergentomyia minuta*, Which Is Not an Exclusive Herpetophilic Species, be Implicated in the Transmission of Pathogens? *Annals of the Entomological Society of America*, 106(1), 79–85.
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., & Molina, R. (2013). Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitology Research*, 112(7), 2453–2459.
- Kent, R. J. (2009). Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 4–18.
- Kent, R. J., & Norris, D. E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2), 336–342.

- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 279–289.
- Kong, F., & Gilbert, G. L. (2006). Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)--a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nat.Protoc.*, 1(1750–2799 (Electronic)), 2668–2680.
- Lee, J. H. A. K., Hassan, H., Hill, G., Cupp, E. W., Higazi, T. B., Mitchell, C. J., Unnasch, T. R. (2002). Identification of Mosquito Avian-Derived Blood Meals By Polymerase Chain Reaction-Heteroduplex Analysis, 66(5), 599–604.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic Matrix Structure and Function. *Annu. Rev. Entomol*, 42(100), 525–50.
- Leishmaniasis, C. (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the. *Pan American Health*, (March), 22–26.
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415–2418.
- Lewis, D. J. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera : Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology Series*, 45(2), 121–209.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4516–22.
- Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite (Paris, France)*, 23, 55.
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, J. M., Freitas, F. B., Afonso, M. O., & Campino, L. (2015). Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8(1), 173.
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., & Mohtarami, F. (2009). Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 3(1), 8–18.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gradoni, L. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: Evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health*, 13(2), 256–264.
- Massebo, F., Balkew, M., Gebre-Michael, T., & Lindtjørn, B. (2015). Zoophagic behaviour of anopheline mosquitoes in southwest Ethiopia: opportunity for malaria vector control. *Parasites & Vectors*, 8(1), 645.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Van Bortel, W., Zeller, H., & Alten, B. (2014). A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of public health importance. *Journal of Vector Ecology : Journal of the Society for Vector Ecology*, 39(1), 72–7.

- Meece, J. K., Reynolds, C. E., Stockwell, P. J., Jenson, T. A., Christensen, J. E., Reed, K. D., Sowers, K. R. (2005). Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. *Journal of Medical Entomology*, 42(4), 657–67.
- Melaun, C., Krüger, A., Werblow, A., & Klimpel, S. (2014). New record of the suspected leishmaniasis vector *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) - The northernmost phlebotomine sandfly occurrence in the Palearctic region. *Parasitology Research*, 113(6), 2295–2301.
- Mukabana, W. R., Takken, W., & Knols, B. G. J. (2002). Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends in Parasitology*, 18(11), 505–509.
- Mullen G. R., Durden L. A.. Medical and Veterinary Entomology, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2009, 637. Str. 13-17. ISBN 0123725003
- Muturi, C. N., Ouma, J. O., Malele, I. I., Ngure, R. M., Rutto, J. J., Mithöfer, K. M., Masiga, D. K. (2011). Tracking the feeding patterns of tsetse flies (*Glossina* genus) by analysis of bloodmeals using mitochondrial cytochromes genes. *PLoS ONE*, 6(2), 1–6.
- Muzari, M. O., Burgess, G. W., Skerratt, L. F., Jones, R. E., & Duran, T. L. (2010). Host preferences of tabanid flies based on identification of blood meals by ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174(3–4), 191–198.
- Mwangangi, J. M., Mbogo, C. M., Nzovu, J. G., Githure, J. I., Yan, G., & Beier, J. C. (2003). Blood-meal analysis for anopheline mosquitoes sampled along the Kenyan coast. *J Am Mosq Control Assoc*, 19(4), 371–375.
- Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J. C., Dufour, B., & Depaquit, J. (2011). Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitology Research*, 108(3), 657–663.
- Oshaghi, M. A., Chavshin, A. R., & Vatandoost, H. (2006). Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. *Experimental Parasitology*, 114(4), 259–264.
- Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., Romero-Ricardo, L., Pérez-Doria, A., Paternina-Gómez, M., Martínez, L., & Bejarano, E. E. (2016). Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta Tropica*, 153, 86–92.
- Pitzer, J. B., Kaufman, P. E., Tenbroeck, S. H., & Maruniak, J. E. (2011). Host blood meal identification by multiplex polymerase chain reaction for dispersal evidence of stable flies (Diptera: Muscidae) between livestock facilities. *Journal of Medical Entomology*, 48(1), 53–60.
- Pruzinova, K., Sadlova, J., Seblova, V., Homola, M., Votypka, J., & Volf, P. (2015). Comparison of Bloodmeal Digestion and the Peritrophic Matrix in Four Sand Fly Species Differing in Susceptibility to *Leishmania donovani*. *Plos One*, 10(6), e0128203.
- Quaresma, P. F., Carvalho, G. M. de L., Ramos, M. C. das N. F., & Filho, J. D. A. (2012). Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 480–485.
- Rasgon, J. L. (2008). Stable isotope analysis can potentially identify completely-digested bloodmeals in mosquitoes. *PLoS ONE*, 3(5), 5–7.

- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, 315–334.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BARCODING, BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(April 2016), 355–364.
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *The Annual Review of Entomology*, 58, 227–250.
- Reeves, L. E., Holderman, C. J., Gillett-Kaufman, J. L., Kawahara, A. Y., & Kaufman, P. E. (2016). Maintenance of host DNA integrity in field-preserved mosquito (Diptera: Culicidae) blood meals for identification by DNA barcoding. *Parasites & Vectors*, 9(1), 503.
- Richards, S. L., Ponnusamy, L., Unnasch, T. R., Hassan, H. K., & Apperson, C. S. (2006). Host-Feeding Patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Relation to Availability of Human and Domestic Animals in Suburban Landscape of Central North Carolina. *J Med Entomol*, 43(3), 543–551.
- Roberts, R. J., & Murray, K. (1976). Restriction endonuclease. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 4(2), 123–164.
- Rogers, M. E. (2012). The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in Microbiology*, 3(JUN), 1–13.
- Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2007). *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*, 3(6), 0818–0825.
- Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sadlova, J., Dwyer, D. M., Volf, P., & Bates, P. A. (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology*, 10(6), 1363–1372.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Maroli, M. (2008). Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropica*, 105(2), 158–165.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Erlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491.
- Sales, K. G. D. S., Costa, P. L., de Moraes, R. C. S., Otranto, D., Brandão-Filho, S. P., Cavalcanti, M. D. P., & Dantas-Torres, F. (2015). Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. *Parasites & Vectors*, 8(1), 230.
- Sant'Anna, M. R. V., Jones, N. G., Hindley, J. A., Mendes-Sousa, A. F., Dillon, R. J., Cavalcante, R. R., Bates, P. A. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Tropica*, 107(3), 230–237.
- Senghor, M. W., Niang, A. A., Depaquit, J., Ferté, H., Faye, M. N., Elguero, E., Bañuls, A.-L. (2016). Transmission of *Leishmania infantum* in the Canine Leishmaniasis Focus of Mont-Rolland, Senegal: Ecological, Parasitological and Molecular Evidence for a Possible Role of *Sergentomyia* Sand Flies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(11), e0004940.
- Schmidt, O., Dautel, H., Newton, J., & Gray, J. S. (2011). Natural isotope signatures of host blood are replicated in moulted ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(4), 225–227.

- Slama, D., Haouas, N., Mezhoud, H., Babba, H., & Chaker, E. (2015). Blood meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Central Tunisia. *PLoS ONE*, 10(3), 1–14.
- Soares, V. Y. R., da Silva, J. C., da Silva, K. R., Pires e Cruz, M. do S., Santos, M. P. D., Ribolla, P. E. M., Costa, C. H. N. (2014). Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(3), 379–383.
- Srinivasan, R., & Panicker, K. N. (1992). Identification of bloodmeals of phlebotomine sandflies using the agarose gel diffusion method. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 23(3), 486–488.
- Stapp, P., & Salkeld, D. J. (2009). Inferring host-parasite relationships using stable isotopes: implications for disease transmission and host specificity. *Ecology*, 90(11), 3268–3273.
- Steuber, S., Abdel-Rady, A., & Clausen, P. H. (2005). PCR-RFLP analysis: A promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitology Research*, 97(3), 247–254.
- Tanure, A., Peixoto, J. C., Afonso, M. M. dos S., Duarte, R., Pinheiro, A. da C., Coelho, S. V. B., & Barata, R. A. (2015). IDENTIFICATION OF SANDFLIES (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) BLOOD MEALS IN AN ENDEMIC LEISHMANIASIS AREA IN BRAZIL. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4), 321–4.
- Torr, S. J., Wilson, P. J., & Schofield, S. (2001). Application of DNA markers to identify the individual-specific hosts of tsetse feeding on cattle. *Science*, 78–86.
- Townzen, J. S., Brower, a. V. Z., Judd, D. D., & Entomology, V. (2008). Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(4), 386–393.
- Valinsky, L., Ettinger, C., Bar-Gal, G. K., & Orshan, L. (2014). Molecular Identification of Bloodmeals from Sand Flies and Mosquitoes Collected in Israel. *Journal of Medical Entomology*, 51(3), 678–685.
- Velasco, E., Infante, M., Durán, M., Pérez-Cabornero, L., Sanz, D. J., Esteban-Cardenosa, E., & Miner, C. (2007). Heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis for rapid mutation detection in large multiexon genes. *Nature Protocols*, 2(1), 237–46.
- Vosberg, H.-P. (1989). The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Human Genetics*, 83(1), 1–15.
- Washino, R. K., & Tempelis, C. H. (1983). MOSQUITO HOST BLOODMEAL IDENTIFICATION : Methodology and Data Analysis. *Ann. Rev. Entomol.*, 28(37), 179–201.
- Weitz, B. (1963). The feeding habits of *Glossina*. *Bulletin of the World Health Organization*, 28, 711–729.
- WHO. (1976). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin of the World Health Organization*, 54(2), 129–139.
- Wickramasekara, S., Bunikis, J., Wysocki, V., & Barbour, A. G. (2008). Identification of residual blood proteins in ticks by mass spectrometry proteomics. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1273–1275.
- Wodecka, B., & Skotarczak, B. (2016). Identification of host blood-meal sources and *Borrelia* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in north-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(1), 59–63.

Woods, M. E., Montenieri, J. A., Eisen, R. J., Zeidner, N. S., Borchert, J. N., Laudisoit, A., Gage, K. L. (2009). Identification of flea blood meals using multiplexed real-time polymerase chain reaction targeting mitochondrial gene fragments. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6), 998–1003.

Sekundární citace

Crans, W. J. (1969). An agar gel diffusion method for the identification of mosquito blood-meals. *Mosquito News*, (29), 563–566.

Washino, R. K., & Tempelis, C. H. (1983). MOSQUITO HOST BLOODMEAL IDENTIFICATION : Methodology and Data Analysis. *Ann. Rev. Entomol.*, 28(37), 179–201.

Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415–2418.